



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ACTINOMICETOS Y HONGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES COMO AGENTES DE
CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ DEL
CHILE**

TESIS

QUE PRESENTA

BIOL. ALFREDO REYES TENA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE TESIS

**DR. LUIS LÓPEZ PÉREZ, (Doctor en biología molecular y
biotecnologías, IIAF-UMSNH)**

CODIRECTORA DE TESIS

**DRA. EVANGELINA ESMERALDA QUIÑONES AGUILAR
(CIATEJ).**

Morelia, Michoacán, Marzo de 2015



El trabajo de esta tesis forma parte del proyecto intitulado:

“Desarrollo de una tecnología para el control biológico de la marchitez del chile por medio de actinomicetos nativos del estado de Aguascalientes”

Financiado por el Fondo Mixto (FOMIX) de Fomento Científico y Tecnológico del Estado de Aguascalientes – Conacyt

(Convocatoria 2011). Clave del proyecto 2011-02-181930

La presente investigación se desarrolló en conjunto entre la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ) A.C. y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH bajo la codirección del Dr. Luis López Pérez y la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar y la asesoría del Dr. Gabriel Rincón Enríquez, Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía y el Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado.

De los resultados de ésta tesis se han presentado los siguientes trabajos.

Ponencia oral: **Promoción del crecimiento y bioprotección por micorrizas y actinomicetos en plantas de chile poblano contra *Phytophthora capsici* L.** Alfredo Reyes Tena. Seminarios de investigación del CIATEJ, Guadalajara Jalisco, 16 de Diciembre de 2014.

5° Foro académico del posgrado en ciencias biológicas y agropecuarias, Morelia Mich. 9 al 11 de Diciembre 2014.

Ponencia oral: Actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares como agentes de control biológico de la marchitez del chile. Alfredo Reyes Tena, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez, Sylvia Patricia Fernández Pavía y Luis López Pérez.

9° Congreso estatal de ciencia tecnología e innovación, Morelia, Mich. 2014.

Ponencia oral: Bioprotección de hongos micorrízicos arbusculares en chile poblano contra *Phytophthora capsici* L. Octubre 2014. Luis López Pérez, Alfredo Reyes Tena, Gabriel Rincón Enríquez, Sylvia P. Fernández Pavía, Gerardo Rodríguez Alvarado, Evangelina E. Quiñones Aguilar.

XVI Congreso Internacional/XLI Congreso Nacional de Fitopatología, Ixtapan de la Sal, México, Julio 2014.

Ponencia oral: Selección de actinomicetos antagonistas a diferentes cepas de *Phytophthora capsici*. Alfredo Reyes-Tena, Sylvia Fernández-Pavía, Gabriel Rincón-Enríquez, Luis López-Pérez y Evangelina Quiñones-Aguilar.

Ponencia poster: Actividad inhibitoria entre actinomicetos antagónicos a *Phytophthora capsici* para la elaboración de formulaciones. Alfredo Reyes-Tena, Sylvia Fernández-Pavía, Gabriel Rincón-Enríquez, Luis López-Pérez y Evangelina Quiñones-Aguilar.

5° Foro académico del posgrado en ciencias biológicas y agropecuarias, Morelia Mich. 4 al 6 de Diciembre 2013.

Ponencia poster: Actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares como agentes de control biológico de la marchitez del chile. Alfredo Reyes-Tena, Evangelina E. Quiñones-Aguilar, Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Gabriel Rincón-Enríquez y Luis López-Pérez.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN GENERAL	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
IV. JUSTIFICACIÓN.....	5
V. HIPÓTESIS GENERAL	7
VI. OBJETIVOS	7
6.1 GENERAL	7
6.2 ESPECÍFICOS	7
VII. RESULTADOS.....	8
CAPÍTULO 1	10
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS CONTRA <i>Phytophthora capsici</i> L. <i>in vitro</i>	10
1.1 RESUMEN	10
1.2 ABSTRACT	11
1.3 INTRODUCCIÓN	11
1.4 HIPÓTESIS.....	13
1.5 OBJETIVOS.....	13
1.6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1.6.1 Actinomicetos	13
1.6.2 <i>Phytophthora capsici</i>	14
1.6.3 Medio de cultivo	14
1.6.4 Ensayo preliminar: Actinomicetos antagónicos a diferentes cepas de <i>Phytophthora capsici</i>	15
1.6.5 Ensayo de confrontación dual: Actividad antimicrobiana individual de diferentes cepas de actinomicetos.	17
1.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
1.7.1 Actinomicetos antagónicos a diferentes cepas de <i>Phytophthora capsici</i>	19
1.7.2 Actividad antimicrobiana individual de diferentes cepas de actinomicetos... ..	28
1.8 CONCLUSIONES	36
1.9 LITERATURA CITADA.....	37
CAPÍTULO 2	40
ANTAGONISMO O COMPATIBILIDAD ENTRE DISTINTOS ACTINOMICETOS.....	40

2.1 RESUMEN	40
2.2 ABSTRACT	41
2.3 INTRODUCCIÓN	41
2.4 HIPÓTESIS	42
2.5 OBJETIVOS	42
2.6 MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.6.1 Diseño experimental	43
2.6.2 Análisis estadístico	45
2.6.3 Escala ordinal de inhibición entre actinomicetos	45
2.6.4 Conservación de actinomicetos y <i>Phytophthora capsici</i>	47
2.6.5 Crioconservación de actinomicetos	47
2.6.6 Conservación de <i>Phytophthora capsici</i>	48
2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
2.8 CONCLUSIONES	57
2.9 LITERATURA CITADA	57
CAPÍTULO 3	59
SELECCIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y BIOPROTECCIÓN CONTRA <i>Phytophthora capsici</i> L. EN CHILE	59
3.1 RESUMEN	59
3.2 ABSTRACT	60
3.3 INTRODUCCIÓN	60
3.4 HIPÓTESIS	61
3.5 OBJETIVO	61
3.6 METODOLOGÍA	62
3.6.1 Reactivación de la capacidad infectiva de <i>Phytophthora capsici</i>	62
3.6.2 Tratamientos evaluados	64
3.6.3 Inoculación de <i>Phytophthora capsici</i>	66
3.6.4 Establecimiento de los experimentos	66
3.6.5 Variables respuesta.	69
3.6.6 Análisis estadísticos	71
3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
3.7.1 Reactivación de la patogenicidad	72
3.7.2 Efecto de los HMA sobre variables de crecimiento en chile serrano y poblano	74

3.7.3 Variables microbiológicas.....	80
3.7.4 Bioprotección por micorrización contra <i>Phytophthora capsici</i>	83
3.8 CONCLUSIONES	89
3.9 LITERATURA CITADA.....	90
CAPÍTULO 4	95
BIOPROTECCIÓN POR HMA Y ACTINOMICETOS EN PLANTAS DE CHILE	
POBLANO CONTRA <i>Phytophthora capsici</i> L.	95
4.1 RESUMEN	95
4.2 ABSTRACT	96
4.3 INTRODUCCIÓN	97
4.4 HIPÓTESIS.....	99
4.5 OBJETIVOS.....	99
4.5.1 General.....	99
4.5.2 Específicos	99
4.6 METODOLOGÍA	99
4.6.1 Propuesta de escala de severidad de <i>Phytophthora capsici</i> en plantas de chile.	99
4.6.2 Experimento de evaluación del crecimiento y bioprotección por HMA y actinomicetos contra <i>Phytophthora capsici</i>	101
4.6.3 Análisis estadístico	107
4.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107
4.7.1 Escala de virulencia de la marchitez por <i>Phytophthora capsici</i>	107
4.7.2 Experimento de evaluación del crecimiento y bioprotección por HMA y actinomicetos contra <i>Phytophthora capsici</i>	111
4.8 CONCLUSIONES	132
4.9 LITERATURA CITADA.....	132
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	136
IX. CONCLUSIÓN GENERAL	138
X. PERSPECTIVAS	139
XI. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA.....	140
XII. ANEXO.....	144
12.1 Constancias y resúmenes de trabajos presentados.	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cepas de actinomicetos evaluadas en los experimentos de antagonismo contra <i>Phytophthora capsici</i> : a) ABV 25; b) ABV 39; c) ABV 49; d) ABV 46; e) ABV 48; f) ABV 65; g) ABV 47; h) ABV 38 i) ABV 37; j) ABV 2; k) ABV 22; y l) ABV45.....	14
Figura 2. Unidad experimental. En el centro de la caja un disco de micelio de <i>Phytophthora capsici</i> (PC), y en los compartimentos un actinomiceto (ACTINO).	16
Figura 3. Confrontación dual en caja Petri donde una cepa de actinomiceto (estrías y disco) (ACTINO) fue confrontada a una cepa de <i>Phytophthora capsici</i> (PC).....	19
Figura 4. Porcentaje de inhibición de <i>Phytophthora capsici</i> . Rojo: PC89, negro: CH11 y gris: PC88. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p<0.05$) en el mismo color de columna.....	20
Figura 5. Inhibición del crecimiento de la cepa PC89 por los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49.	20
Figura 6. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa PC89 de <i>Phytophthora capsici</i> por los actinomicetos: ABV46, ABV02, ABV65 y AVB48.....	21
Figura 7. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa PC89 de <i>Phytophthora capsici</i> por los actinomicetos: ABV22, ABV47, ABV38 y AVB37.....	21
Figura 8. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa PC89 de <i>Phytophthora capsici</i> por los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y AVB49.....	22
Figura 9. Susceptibilidad de las cepas de <i>Phytophthora capsici</i> CH11, PC88 y PC89. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p<0.05$).....	23
Figura 10. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> por los actinomicetos: ABV46, ABV02, ABV65 y AVB48.....	24
Figura 11. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> por parte de los actinomicetos: ABV22, ABV47, ABV38 y AVB37.....	25
Figura 12. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> por parte de los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y AVB49.....	25
Figura 13. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> respecto al control por parte de los actinomicetos: ABV46, ABV02, ABV65 y AVB48.	26
Figura 14. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> respecto al control por parte de los actinomicetos: ABV22, ABV47, ABV38 y AVB37.	27

Figura 15. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> respecto al control por parte de los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y AVB49.	27
Figura 16. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> por cepas de actinomicetos. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).	30
Figura 17. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV39 sobre el crecimiento de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	30
Figura 18. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV38 sobre el crecimiento de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	31
Figura 19. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV49 sobre el crecimiento de la cepa CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	31
Figura 20. Inhibición del crecimiento de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> por actinomicetos. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).	33
Figura 21. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV39 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	33
Figura 22. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV45 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	34
Figura 23. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV38 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	34
Figura 24. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV25 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> . Testigo = sin actinomiceto.	35
Figura 25. Inhibición del crecimiento por cepas de actinomicetos sobre las cepas CH11 y PC88 de <i>Phytophthora capsici</i> . Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).	36
Figura 26. Vista general del diseño de confrontación dual <i>in vitro</i> entre cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana.	45
Figura 27. Escala ordinal de inhibición entre actinomicetos. (I) representación de manera esquemática de la escala cualitativa de inhibición del crecimiento entre las cepas de actinomicetos. (II) representación <i>in vitro</i> de la escala cualitativa de inhibición del crecimiento entre las cepas de actinomicetos.	46
Figura 28. Dispositivo para filtrado de esporas de actinomicetos (A), el filtrado de esporas antes de lavado (B) y después de lavados con agua destilada (C).	48

Figura 29. Inhibición entre cepas de actinomicetos en confrontación dual <i>in vitro</i>	49
Figura 30. Nivel de inhibición del crecimiento entre combinaciones de actinomicetos con actividad antimicrobiana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a Duun ($p<0.05$).	54
Figura 31. Colocación de discos con micelio de <i>Phytophthora capsici</i> en plantas de chile serrano para la inoculación y reactivación de la capacidad infectiva.	62
Figura 32. Planta de chile serrano con síntomas de marchitez provocada por <i>Phytophthora capsici</i>	63
Figura 33. Trozos de tejido enfermo por marchitez provocada por <i>Phytophthora capsici</i> en PDA.....	64
Figura 34. Macetas con sustrato estéril para el establecimiento de los experimentos con plantas de chile.	67
Figura 35. Inóculos de HMA aplicados durante el establecimiento de los experimentos. Cada inóculo constó de 80 esporas.	68
Figura 36. Inoculación de HMA al momento del trasplante: a) chile serrano, b) chile poblano.	68
Figura 37. Síntomas de marchitez en plantas de chile serrano infectadas para la reactivación de la capacidad infectiva de <i>Phytophthora capsici</i>	73
Figura 38. Crecimiento de las cepas PC88 y CH11 de <i>Phytophthora capsici</i> en PDA para aislamiento y purificación a partir de tejido vegetal enfermo.....	74
Figura 39. Efecto de la micorrización en la altura de plantas de chile serrano a los 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p<0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).....	75
Figura 40. Efecto de la micorrización en el diámetro a la base del tallo en plantas de chile serrano a 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente distintos según Tukey ($p<0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).....	76
Figura 41. Efecto de la micorrización sobre el número de hojas en plantas de chile serrano a 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p<0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).....	77

Figura 42. Efecto de la micorrización en la altura de plantas de chile poblano a 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA). 78

Figura 43. Crecimiento de las plantas de chile serrano a 56 días después de inoculación con los HMA. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA), *Rhizophagus intraradices* (INIFAP). La escala al fondo de la imagen representa 20 cm, cada cuadro representa 1 cm. 78

Figura 44. Crecimiento de las plantas de chile poblano a 56 días después de inoculación con los HMA. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA), *Rhizophagus intraradices* (INIFAP). La escala al fondo de la imagen representa 20 cm, cada cuadro representa 1 cm. 79

Figura 45. Estructuras que reflejan la colonización micorrízica en plantas de chile serrano y poblano: a), b), c) vesículas; d) y e) esporas; f) y g) micelio. 80

Figura 46. Colonización micorrízica en chile serrano y poblano a los 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA). 81

Figura 47. Número de esporas en 100 g de suelo seco en chile serrano y poblano, 56 días después de establecido el experimento. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA). 83

Figura 48. Nivel de severidad con base en la escala de virulencia en plantas de chile serrano a 21 días después de la inoculación de *Phytophthora capsici*. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes de acuerdo a Dunn ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA). 84

Figura 49. Severidad de la enfermedad en plantas de chile serrano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Las Campesinas (LC), Cerro del Metate (CM), Sin HMA (S/HMA). 86

Figura 50. Biomasa fresca aérea y radical de plantas de chile serrano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. El Huizachal (EH), Las

Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA)..... 87

Figura 51. Nivel de severidad en base a la escala de virulencia en plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes de acuerdo a Dunn ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA). 87

Figura 52. Daño en plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Tratamientos: CM, S/HMA y RCR. Rancho Carlos Rojas (RCR), Cerro del Metate (CM), Sin HMA (S/HMA)..... 88

Figura 53. Biomasa fresca aérea y radical de plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA)..... 89

Figura 54. Severidad de la marchitez en plantas de chile poblano cultivar San Luis de acuerdo a la micorrización y/o inoculación de actinomicetos. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticas significativas, Dunn ($p < 0.05$). CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02 combinados), S/ACT (Sin actinomiceto), CH11 (Cepa CH11 de *Phytophthora capsici*). 120

Figura 55. Severidad de la marchitez en plantas de chile poblano a los 82 días después del trasplante (20 días después de la inoculación de *Phytophthora capsici*). Tratamientos: a) CM-39-CH11, b) CM-02-CH11, c) CM-(30-02)-CH11, d) CM-S/ACT-S/PC, e) S/HMA-39-CH11, f) S/HMA-02-CH11, g) S/HMA-(39-02)-S/PC y h) S/HMA-S/ACT-CH11. CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto, CH11 (Cepa de *Phytophthora capsici*). 121

Figura 56. Estructuras micorrízicas observadas en plantas de chile poblano a los 82 DDT, a) micelio extrarradical, b) micelio intrarradical, c) micelio y vesículas, d) y e) micelio y arbuscúlos, f) esporas..... 126

Figura 57. Infección de raíces por *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano a los 82 DDT. Las flechas en color rojo indican raíces donde creció el fitopatógeno y representan raíces infectadas. 127

Figura 58. Interacciones entre los factores actinomiceto y HMA sobre la biomasa seca total en plantas de chile poblano a los 82 DDT. 128

Figura 59. Interacciones entre los factores actinomiceto y HMA sobre la severidad de la marchitez en plantas de chile poblano a los 82 DDT. 129

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño de tratamientos (TRAT) evaluados correspondientes a los diferentes actinomicetos (ACTINO) y las 3 cepas de <i>Phytophthora capsici</i> (PC).	15
Cuadro 2. Esquema de combinaciones de confrontación dual <i>in vitro</i> entre cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana.	44
Cuadro 3. Inhibición de las 78 combinaciones de actinomicetos en base a la escala de inhibición del crecimiento.	50
Cuadro 4. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de las combinaciones entre las cepas de actinomicetos más efectivas en cuanto a inhibición de <i>Phytophthora capsici</i>	55
Cuadro 5. Diseño experimental para la selección de HMA en chile serrano.	65
Cuadro 6. Diseño experimental para la selección de HMA en chile poblano.	65
Cuadro 7. Escala de virulencia descrita por Quinto-Álvarez (2014).	71
Cuadro 8. Diseño de tratamientos del experimento sobre evaluación del crecimiento y bioprotección por HMA y actinomicetos contra <i>Phytophthora capsici</i>	101
Cuadro 9. Diseño experimental de bloques completos al azar.	102
Cuadro 10. Escala cualitativa ordinal de virulencia por <i>Phytophthora capsici</i> en plantas de chile poblano cultivar San Luis.	108
Cuadro 11. Altura, diámetro del tallo y número de hojas a los 70 días después del trasplante de chile poblano cultivar San Luis bajo condiciones de invernadero	112
Cuadro 12. Variables microbiológicas evaluadas a los 50 días después del trasplante de chile poblano cultivar San Luis, bajo condiciones de invernadero.	113
Cuadro 13. Biomasa fresca (hojas, tallo, raíz y fruto), área foliar y volumen radical en plantas de chile poblano micorrizadas y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.	115
Cuadro 14. Biomasa seca (hojas, tallo, raíz y fruto) en plantas de chile poblano micorrizadas y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.	116
Cuadro 15. Biomasa fresca (hojas, tallo, raíz y fruto), área foliar y volumen radical en plantas de chile poblano micorrizadas, infectadas con <i>Phytophthora capsici</i> y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.	117

Cuadro 16. Biomasa seca (hojas, tallo, raíz y fruto) en plantas de chile poblano micorrizadas, infectadas con <i>Phytophthora capsici</i> y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.....	118
Cuadro 17. Variables microbiológicas evaluadas al final del experimento (82 días después del trasplante) de plantas de chile cultivar San Luis, bajo condiciones de invernadero.....	124
Cuadro 18. Coeficiente de correlaciones de Pearson entre las variables de crecimiento, morfológicas y microbiológicas evaluadas en el experimento de chile poblano cultivar San Luis bajo condiciones de invernadero.....	131

I. RESUMEN GENERAL

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es de gran importancia económica a nivel mundial. La principal limitante para su producción es la marchitez causada por *Phytophthora capsici*. Con el objetivo de evaluar la aplicación de actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la promoción del crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile, se desarrollaron diferentes experimentos donde se evaluó: 1) La actividad antimicrobiana de actinomicetos contra *Phytophthora capsici* L. *in vitro*, 2) El antagonismo o compatibilidad entre distintos actinomicetos, 3) El efecto de distintos inóculos de hongos micorrízicos arbusculares como promotores de crecimiento vegetal y bioprotector contra *Phytophthora capsici* L. en plantas de chile y, 4) La Bioprotección por HMA y actinomicetos contra *Phytophthora capsici* L en plantas de chile poblano. Los resultados mostraron que los actinomicetos tuvieron una alta actividad antimicrobiana contra *Phytophthora capsici in vitro*, las cepas más efectivas en inhibir el crecimiento del fitopatógeno fueron: ABV39, ABV45 y ABV38. En el experimento de antagonismo/compatibilidad entre actinomicetos se encontró que, los actinomicetos ABV39 y ABV02 son recomendables para aplicar conjuntamente en experimentos *in planta* al no inhibirse entre ellos. Por otro lado, a partir de siete consorcios micorrízicos se encontró que, el consorcio nativo Cerro del Metate (CM) promovió el crecimiento en plantas de chile serrano y poblano, además de reducir la severidad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici*. Finalmente, se encontró un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento y reducción de la severidad de la marchitez en plantas de chile poblano, cuando se inocularon con el consorcio micorrízico CM y alguna de las cepas ABV39 o ABV02 de actinomicetos. Se encontró que, la colonización micorrízica impidió una mayor infección de raíces por *Phytophthora capsici*. En conclusión, el uso de actinomicetos y HMA es un recurso microbiológico de interés para su aplicación en la promoción del crecimiento vegetal y bioprotección contra *Phytophthora capsici*.

Palabras clave: *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*, *Streptomyces*, antagonismo, HMA.

II. ABSTRACT

The chilli crop (*Capsicum annuum* L.) has great economic importance worldwide. The main limiting factor for its production is the wilting caused by *Phytophthora capsici*. In order to evaluate the application of actinomycetes and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in promoting growth and bioprotection against *Phytophthora capsici* in chilli plants, different experiments were performed: 1) The antimicrobial activity of actinomycetes against *Phytophthora capsici* L. *in vitro*, 2) The antagonism or compatibility between different actinomycetes, 3) The effect of different inocula of arbuscular mycorrhizal fungi like plant growth promoters and bioprotector against *Phytophthora capsici* L. in chilli plants and, 4) The Bioprotection by AMF and actinomycetes against *Phytophthora capsici* L on poblano chilli plants. The results showed that the actinomycetes had high antimicrobial activity against *Phytophthora capsici* *in vitro*, the most effective strains in inhibiting the growth of the phytopathogen were, ABV39, ABV45 and ABV38. In the experiment antagonism/compatibility between actinomycetes, was found that the actinomycetes ABV02 and ABV39 are recommended for combined application in experiments *in plant*, because not inhibited between them. On the other hand, from seven mycorrhizal consortia, we found that the consortium Cerro of Metate (CM) promoted growth in plants of poblano and serrano chili, and reduce the severity of wilt caused by *Phytophthora capsici*. Finally a synergistic effect in promoting growth and reducing the severity of wilt was found on poblano chili plants, when inoculated with the CM mycorrhizal consortium and ABV02 or ABV39 strains of actinomycetes. Furthermore it was found that mycorrhizal colonization prevents higher infection of roots by *Phytophthora capsici*. In conclusion, the use of AMF and actinomycetes is a microbiological resource of interest for the promotion of plant growth and bioprotection against *Phytophthora capsici*.

Key words: *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*, *Streptomyces*, antagonism, AMF

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de chile es una actividad económica importante dentro del sector agropecuario, en el 2010 México ocupó el primer lugar mundial en la producción de chile verde con 2.33 millones de toneladas en una superficie de 148, 758 hectáreas (SIAP, 2010). Además de la importancia económica, en México se le considera una hortaliza de interés cultural y biológico, debido a que éste país es centro de origen del género *Capsicum*.

La producción de chile se ha visto mermada por la proliferación de enfermedades, entre ellas la más importante tanto a nivel nacional como a nivel mundial es la marchitez provocada por el oomicete fitopatógeno *Phytophthora capsici* Leo. Los daños ocasionados por esta enfermedad son considerables (hasta el 80% del cultivo), al infectar la base del tallo provoca un estrangulamiento del xilema interrumpiendo el flujo de savia, lo que ocasiona clorosis, defoliación rápida, pudrición de frutos y muerte de la planta (Espinosa-Victoria, 2004; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010). Para el control de ésta enfermedad existen diversos fungicidas tales como: azoxystrobin, metalaxyl, propamocarb, fosetyl-aluminio, entre otros (Pérez-Moreno *et al.*, 2002). Sin embargo, no se obtienen resultados satisfactorios sobre el agente patógeno al ser resistente a muchos de estos productos, lo que indirectamente eleva el costo de producción. Debido a la baja eficacia de este tipo de control, una práctica agrícola que se utiliza frecuentemente es el traslado del cultivo hacia zonas libres del agente causal, o bien el abandono y/o sustitución por otros cultivos.

El manejo agrícola convencional para el control de la enfermedad que incluye la aplicación excesiva de agroquímicos fúngicos, trae consecuencias negativas sobre los ecosistemas y la salud humana; se ha reportado que la mayoría de los ingredientes activos de estos productos son potencialmente cancerígenos (Gomez-Perazoli *et al.*, 2000).

En la actualidad ha surgido un mayor interés en la generación de conocimiento para el diseño e implementación de sistemas de producción agrícola sustentables como la agricultura orgánica que además de la nutrición

vegetal a través de microorganismos que incrementan la disponibilidad de nutrimentos minerales, abarca también el manejo agroecológico de enfermedades mediante el control biológico (Molina-Gayosso, 2010), el cual es el control de plagas y agentes patógenos mediante la aplicación de enemigos naturales (Rodríguez del Bosque y Arredondo-Bernal, 2007). Entre las ventajas del control biológico respecto al control químico están: baja toxicidad, agentes biológicos que existen en el ecosistema, baja o nula patogenicidad sobre la fauna benéfica, no generan resistencia a plagas y enfermedades, ayudan a la recuperación biológica de los suelos, reducción de costos debido a que el enemigo natural se autorregula en función de las poblaciones de microorganismos fitopatógenos.

Los hongos micorrízico arbusculares (HMA), son comúnmente aplicados para mejorar la nutrición de las plantas al incrementar la disponibilidad de nutrientes minerales poco solubles, agua y otros beneficios; proporcionando a la planta una mejor resistencia a estrés de tipo hídrico, salino o agentes tóxicos (Smith y Read, 1997). Además de esto, son capaces de proteger contra enfermedades a través de diferentes mecanismos de acción (Newsham, *et al.*, 1995), como lo es la inducción de resistencia sistémica adquirida mediada a través de señales hormonales como el ácido jasmónico, ácido salicílico (Jung-Sabine *et al.*, 2012; Herrera-Medina *et al.*, 2008) ácido abscísico (Fiorilli *et al.*, 2011). Se ha documentado que los HMA reducen la susceptibilidad e incrementan la producción y protección en chile contra *P. capsici* (Ozgonen y Erkilic, 2007; Gómez-Dorantes *et al.*, 2008; León-Piña, 2008).

Por otro lado los actinomicetos, son un grupo de bacterias presente en la rizósfera que ha sido poco estudiado en respecto a su aplicación biotecnológica en agricultura, son potencialmente aplicables en la promoción del crecimiento vegetal ya que secretan fitohormonas, mejoran la estructura del suelo y producen compuestos bioactivos con actividad antagonista contra fitopatógenos, además de ser los principales productores de antibióticos en la naturaleza (Franco-Correa, 2008; Bautista-Calles *et al.*, 2010).

Los actinomicetos también son capaces de solubilizar nutrientes como el fósforo el cual puede incrementar su disponibilidad hacia las plantas micorrizadas, producen enzimas degradativas (peroxidasas, glucanasas y quitinasas) de la pared celular de ciertos micoparásitos, (Xuan-Hoa *et al* 2012).

Por este motivo se desarrolló un estudio acerca del biocontrol de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile, mediante la aplicación de microorganismos de control biológico como consorcios de hongos micorrízicos arbusculares y actinomicetos. Previamente se realizaron dos ensayos de antagonismo *in vitro* con actinomicetos contra el fitopatógeno (ensayo de antagonismo preliminar y confrontación dual), paralelamente se analizó la compatibilidad/antagonismo entre combinaciones duales de los actinomicetos. Posteriormente se evaluó el efecto promotor del crecimiento y la bioprotección contra la marchitez por parte de consorcios de HMA y finalmente, se evaluaron las mejores cepas de actinomicetos y el mejor consorcio micorrízico en plantas de chile variedad “Poblano” contra la marchitez, en condiciones de invernadero. Los resultados mostraron que los actinomicetos son capaces de inhibir el crecimiento de *Phytophthora capsici* *in vitro*, además de que, la coinoculación con HMA reduce el nivel de severidad de la marchitez *in planta*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son potencialmente aplicables como microorganismos de control biológico de enfermedades en plantas, al inducir resistencia sistémica contra los agentes fitopatógenos. Se ha determinado la participación en la inducción de la síntesis de fitohormonas relacionadas con la respuesta hacia el ataque de fitopatógenos como el ácido jasmónico y ácido salicílico (Jung-Sabine *et al.*, 2012). En el caso particular del chile se han publicado trabajos sobre las ventajas de la micorrización en el control de *Phytophthora capsici*, Ozgonen y Erkilic (2007), encontraron que la inoculación de *Glomus mosseae* en plantas inoculadas con el patógeno tuvo un porcentaje de efectividad del 91.7% en la reducción de los síntomas de la enfermedad en condiciones de maceta, 43.0% en invernadero y 57.2% en

condiciones de campo. Esto demuestra la capacidad de los HMA para el control de *Phytophthora capsici* al competir por espacio dentro de la rizósfera y por carbohidratos dentro de la raíz, además de la inducción de resistencia sistémica relacionada con el incremento de fitoalexinas (capsidiol) tóxicas para el fitopatógeno. Trotta *et al.* (1996) inoculando plantas de jitomate con *Glomus mosseae* y *Phytophthora nicotianae*, observaron que nunca ocuparon simultáneamente los mismos tejidos de la raíz. En otro estudio en plantas de tomate Firorilli *et al.* (2011) demostraron que la simbiosis micorrízica redujo la gravedad de la enfermedad en las plantas infectadas por *Botrytis cinerea* y sugieren que el ácido abscísico (ABA) es un inductor de la respuesta de defensa contra el patógeno mediada por la simbiosis micorrízica al incrementar su concentración.

Si bien la inoculación de HMA reduce la gravedad de enfermedades fúngicas en las plantas, la coinoculación con otros microorganismos benéficos y agentes de control biológico podría tener un efecto sinérgico, de acuerdo con Miransari (2011), sugiere que la micorrizósfera constituye un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos antagónicos a patógenos del suelo en donde el micelio extrarradical provee de nichos ricos en nutrientes a través de la liberación de exudados como la glomalina favoreciendo el establecimiento de rizobacterias benéficas como es el caso de actinomicetos. Por otro lado Lioussanne (2010) concluye que la capacidad de los HMA para controlar las enfermedades está estrechamente relacionada con su capacidad para establecer relaciones sinérgicas con rizobacterias.

No existen estudios acerca de la coinoculación de HMA y actinomicetos y su efecto sinérgico contra patógenos de plantas, es por ello que en este trabajo se evaluaron consorcios micorrízicos y cepas de actinomicetos en la bioprotección contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile bajo condiciones de invernadero.

V. HIPÓTESIS GENERAL

- La coinoculación de hongos micorrízicos arbusculares y actinomicetos incrementa la biomasa vegetal e induce un efecto sinérgico en la bioprotección contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile.

VI. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

- Evaluar la promoción del crecimiento y el efecto bioprotector de la inoculación de HMA y actinomicetos en plantas de chile contra *Phytophthora capsici*.

6.2 ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes cepas de actinomicetos contra diferentes cepas de *Phytophthora capsici* en una prueba de antagonismo en condiciones *in vitro*.
- Seleccionar las mejores cepas de actinomicetos respecto a la inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* en un ensayo de confrontación dual *in vitro*.
- Analizar la aplicación combinada entre diferentes cepas de actinomicetos mediante la evaluación del antagonismo en un ensayo de confrontación dual *in vitro*.
- A partir de siete consorcios de HMA, seleccionar el mejor en plantas de chile con base en la promoción del crecimiento vegetal y reducción de la severidad de la marchitez causada por *Phytophthora capsici*, bajo condiciones de invernadero.
- Establecer una escala de severidad de *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano bajo condiciones de invernadero.
- Evaluar la promoción del crecimiento y bioprotección contra la marchitez por medio de la coinoculación de HMA y actinomicetos en plantas de chile poblano.

VII. RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos específicos de esta investigación, los resultados de éste trabajo se presentan en cuatro capítulos estructurados de la siguiente manera: resumen, introducción, objetivos, metodología, resultados y discusión, y conclusiones. En el capítulo uno, se evaluó la actividad antimicrobiana de doce diferentes cepas de actinomicetos mediante dos ensayos de antagonismo *in vitro* contra *Phytophthora capsici* (prueba preliminar de la actividad antimicrobiana y confrontación dual). En ambos casos los resultados se presentan como la inhibición del crecimiento expresada en porcentaje. Se encontraron altos porcentajes de inhibición del fitopatógeno por diferentes cepas de actinomicetos.

En el capítulo dos, con el objetivo de evaluar la aplicación de actinomicetos en combinación dual, se analizó el antagonismo entre diferentes combinaciones de actinomicetos mediante un ensayo de confrontación dual *in vitro*. Los resultados nuevamente se presentan en base al nivel de inhibición con respecto a una escala cualitativa ordinal de inhibición entre actinomicetos propuesta en éste capítulo. Se encontró que doce diferentes combinaciones de actinomicetos no presentaron inhibición entre ellos, por lo que podrían aplicarse en combinación contra fitopatógenos *in planta*.

En el capítulo tres, se evaluaron siete consorcios micorrízicos en la promoción del crecimiento vegetal y la bioprotección contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile bajo condiciones de invernadero. En éste capítulo se analizaron diferentes variables de crecimiento y microbiológicas, donde se encontró que un consorcio micorrízico fue capaz de promover mayor crecimiento vegetal y reducir el nivel de severidad de la marchitez.

Finalmente en el capítulo cuatro, se evaluó la coinoculación de actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares como promotores del crecimiento vegetal y bioprotectores contra la marchitez. Los actinomicetos evaluados correspondieron a las mejores cepas con actividad antimicrobiana y

que fueran compatibles entre ellas (a partir de los resultados de experimentos previos, capítulos uno y dos), se utilizó el consorcio micorrízico que promovió el crecimiento y disminuyó la severidad de la marchitez (resultado del capítulo tres). Los resultados encontrados en éste capítulo permitieron concluir que la aplicación de HMA y actinomicetos fue capaz de reducir la marchitez en plantas de chile.

CAPÍTULO 1

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACTINOMICETOS CONTRA *Phytophthora capsici* L. *in vitro*

1.1 RESUMEN

Se evaluó la capacidad antagónica *in vitro* de 12 cepas de actinomicetos aislados de suelo rizosférico de *Agave* del estado de Michoacán contra tres cepas de *Phytophthora capsici*. Por lo cual, se realizaron dos ensayos: en el primero se determinó la capacidad antagónica de los actinomicetos y posteriormente se realizó un ensayo de confrontación dual para evaluar la actividad antimicrobiana de cada una de las cepas de manera individual. En el primer ensayo se evaluaron las cepas de actinomicetos: AVB02, ABV46, ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49, contra tres cepas de *Phytophthora capsici*: PC88, PC89 y CH11. Los resultados del primer ensayo mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0.05$), donde los doce actinomicetos presentaron actividad antimicrobiana contra el fitopatógeno, llegando todos a inhibir en un 100% el crecimiento de la cepa PC89; en la cepa PC88 se obtuvo una inhibición entre 96 y 100% y finalmente a la cepa CH11 de un 84 al 99%. En el ensayo de confrontación dual la cepa ABV39 fue la más efectiva al inhibir el crecimiento de las cepas CH11 y PC88 de *Phytophthora capsici* en intervalo del 71 y 86% respectivamente. El actinomiceto ABV38 inhibió el crecimiento del fitopatógeno en 63 y 69% respectivamente, y la cepa ABV45 inhibió en el orden del 53 y 73%. La actividad antagónica de estos actinomicetos se debió a la competencia por espacio y nutrientes además de antibiosis por medio de la secreción de compuestos bioactivos al observarse que *Phytophthora capsici* no creció en la zona donde se dispersaron los metabolitos secundarios de los actinomicetos. Debido a la actividad antimicrobiana mostrada sobre el fitopatógeno, éstas cepas de actinomicetos podrían ser aplicadas como bioprotectores contra *Phytophthora capsici* en experimentos posteriores *in planta*.

1.2 ABSTRACT

The antagonistic capacity *in vitro* of 12 strains of actinomycetes isolated from rhizosphere soil of *Agave* the state of Michoacán against three strains of *Phytophthora capsici* was evaluated. For this, two assays were performed: one the antagonistic capacity of the actinomycetes was determined and then a dual confrontation test was conducted to evaluate the antimicrobial activity of each of the individual strains. In the first test, the actinomycetes strains: AVB02, ABV46 ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25 and ABV49 were evaluated against three strains of *Phytophthora capsici*: PC88, PC89 and CH11. The results of the first test showed statistical differences between treatments ($p < 0.05$), the twelve actinomycetes had antimicrobial activity against the phytopathogen, inhibiting the growth of the strain PC89 in a 100%; on strain PC88 an inhibition between 96 and 100% was found, and to the strain CH11 the inhibition was the 84 to 99%. In the dual confrontation assay, the ABV39 strain was the most effective at inhibiting the growth of CH11 and PC88 *Phytophthora capsici* strains, in the range of 71 and 86% respectively. The ABV38 actinomycete inhibited the growth of phytopathogen in 63 and 69% respectively, and the ABV45 strain inhibited in the order of 53 and 73%. The antagonistic activity of these actinomycetes was due to competition for space and nutrients besides antibiosis through secretion of bioactive compounds since *Phytophthora capsici* did not grow in the area where the secondary metabolites of the actinomycetes were dispersed. Due the antimicrobial activity against on the phytopathogen, these actinomycetes strains can be applied in future experiments as bioprotectors against *Phytophthora capsici* *in planta*.

1.3 INTRODUCCIÓN

Un grupo importante de microorganismos antagónicos a fitopatógenos de plantas son los actinomicetos, los cuales inhiben la germinación de esporas de hongos fitopatógenos mediante la secreción de metabolitos secundarios entre ellos diversos antibióticos y por otro lado enzimas degradativas de la pared celular (Franco-Correa, 2008; Xuan-Hoa *et al.*, 2012); inclusive pueden ser capaces de disminuir la incidencia de virus fitopatógenos mediante la producción de sustancias antivirales e inducción de resistencia sistémica al ser

inoculados en la planta antes de ser expuestas al agente patógeno (Abdel-Moneim, 2006). Diversas cepas de actinomicetos aislados de suelo pueden ser un recurso microbiológico importante para controlar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Evangelista-Martínez, 2014). Es por ello que la evaluación de su actividad antimicrobiana ha sido estudiada contra diversos hongos y oomycetes, entre ellos *Rhizoctonia solani* (Castillo, 2004; Hemant *et al.*, 2011; Sánchez-Ovalle *et al.*, 2011); *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*, *Curvularia sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Rhizoctonia sp.*, (Evangelista-Martínez, 2014); *Pythium aphanidermatum* (El-Tarabily, 2006); *Phytophthora sp.* (Xiao *et al.*, 2002) y *Phytophthora capsici* (Ezziyyani *et al.*, 2004). La aplicación biotecnológica de los actinomicetos en el control biológico de enfermedades aún está en desarrollo y es necesaria la búsqueda de nuevas cepas con actividad antagónica contra fitopatógenos de importancia económica (Medina Cuevas y Evangelista-Martínez, 2011).

La gran mayoría de los trabajos de antagonismo de actinomicetos contra patógenos de plantas se han desarrollado en condiciones *in vitro*. Por lo general, se comienza con pruebas preliminares para determinar si poseen actividad antimicrobiana sobre el fitopatógeno de interés y posteriormente evaluar cada una de las cepas o aislados de manera individual. En las pruebas de antagonismo para la evaluación individual de cada una de las cepas, es necesario realizar ensayos de confrontación dual para determinar el grado de inhibición del crecimiento del fitopatógeno (Reyes-Ramírez *et al.*, 2012). Esto es debido a que, cuando se hacen pruebas primarias para determinar las cepas con actividad antimicrobiana a fitopatógenos (donde se colocan discos de micelio de diferentes actinomicetos en una placa de cultivo), éstos podrían enmascarar el efecto inhibitorio de las cepas circundantes principalmente por los metabolitos secundarios que se esparcen en el medio de cultivo, o bien, por la capacidad invasiva de algunas cepas que pueden crecer e inclusive parasitar al resto de actinomicetos presentes en la placa incluyendo al patógeno.

En éste capítulo se evaluó la actividad antimicrobiana bajo condiciones *in vitro* de diferentes cepas de actinomicetos provenientes de rizósfera de

Agave del estado de Michoacán en la inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *Phytophthora capsici*.

1.4 HIPÓTESIS

Distintas cepas de actinomicetos son capaces de inhibir el crecimiento de *Phytophthora capsici* en condiciones *in vitro*.

1.5 OBJETIVOS

- Determinar la actividad antimicrobiana de diferentes cepas de actinomicetos mediante la inhibición del crecimiento de diferentes cepas de *Phytophthora capsici* *in vitro*.
- Determinar la susceptibilidad de las diferentes cepas de *Phytophthora capsici* a la presencia de actinomicetos *in vitro*.
- Determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* por parte de cada uno de los actinomicetos en confrontación dual *in vitro*.
- Seleccionar las mejores cepas de actinomicetos en base a la inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici*.

1.6 MATERIALES Y MÉTODOS

1.6.1 Actinomicetos

Los actinomicetos que se evaluaron en los ensayos de antagonismo fueron aislados previamente de suelos agaveros del estado de Michoacán; y seleccionados de acuerdo a estudios previos de inhibición sobre *Phytophthora capsici*, realizados en el Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), a partir de 80 se seleccionaron las 12 cepas con mayor actividad antimicrobiana, que fueron: ABV46, ABV2, ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25, y ABV49 (Figura 1). Los experimentos de este trabajo se desarrollaron conjuntamente en el laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH y la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

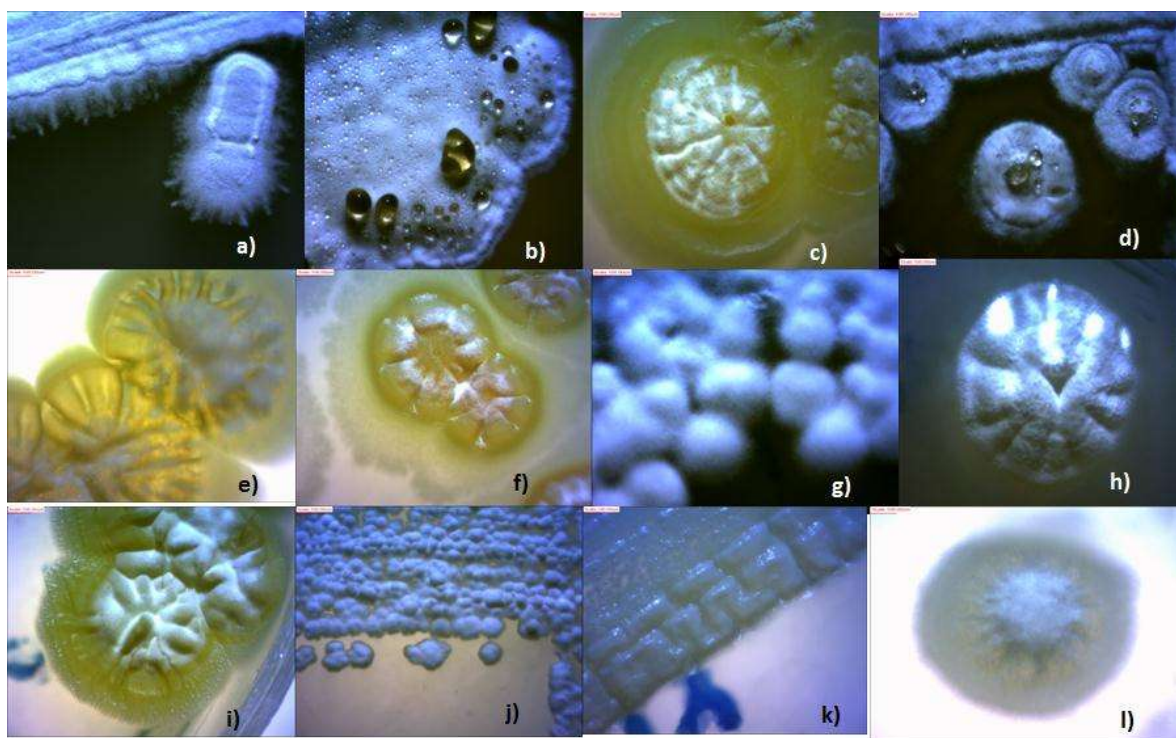


Figura 1. Cepas de actinomicetos evaluadas en los experimentos de antagonismo contra *Phytophthora capsici*: a) ABV 25; b) ABV 39; c) ABV 49; d) ABV 46; e) ABV 48; f) ABV 65; g) ABV 47; h) ABV 38 i) ABV 37; j) ABV 2; k) ABV 22; y l) ABV45.

1.6.2 *Phytophthora capsici*

Las cepas de *Phytophthora capsici* que se evaluaron en los experimentos, fueron aisladas de cultivos de chile enfermos por marchitez de Michoacán (CH11) y Aguascalientes (PC88 y PC89). Las cepas fueron proporcionadas por la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF.

1.6.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para establecer los ensayos fue PDA (Agar, papa-dextrosa). Se utilizaron 39 gramos de PDA en polvo para disolver en un litro de agua destilada, después de disolver se ajustó a pH 7, teniendo en cuenta que el intervalo de pH al cual el patógeno se desarrolla se encuentra de 5 a 8. El experimento se incubó a 25°C durante el desarrollo de todo el experimento.

1.6.4 Ensayo preliminar: Actinomicetos antagónicos a diferentes cepas de *Phytophthora capsici*

Se desarrolló un ensayo preliminar para determinar la capacidad antimicrobiana de los 12 actinomicetos sobre las cepas PC88, PC89 y CH11 de *Phytophthora capsici*.

a) Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue factorial completamente al azar y constó de 36 tratamientos con cuatro repeticiones. Se evaluó el factor actinomiceto con doce niveles correspondientes a las doce cepas de actinomicetos; el factor *Phytophthora capsici* con tres niveles correspondientes a las cepas PC88, PC89 y CH11; más tres controles donde únicamente se colocó el fitopatógeno. Por cada cepa del fitopatógeno se evaluaron 12 tratamientos (Cuadro 1). La Unidad Experimental (UE) consistió en $\frac{1}{4}$ de una caja Petri.

b) Análisis estadísticos

A los datos se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza se realizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II.

Cuadro 1. Diseño de tratamientos (TRAT) evaluados correspondientes a los diferentes actinomicetos (ACTINO) y las 3 cepas de *Phytophthora capsici* (PC).

FACTORES				
ACTINOMICETO	<i>P. capsici</i>	TRATAMIENTOS		
ABV46	CH11	T1 ABV46-CH11	T13 ABV46-PC89	T25 ABV46-PC88
ABV02	PC89	T2 ABV02-CH11	T14 ABV02-PC89	T26 ABV02-PC88
ABV65	PC88	T3 ABV65-CH11	T15 ABV65-PC89	T27 ABV65-PC88
ABV48		T4 ABV48-CH11	T16 ABV48-PC89	T28 ABV48-PC88
ABV22		T5 ABV22-CH11	T17 ABV22-PC89	T29 ABV22-PC88
ABV47		T6 ABV47-CH11	T18 ABV47-PC89	T30 ABV47-PC88
ABV38		T7 ABV38-CH11	T19 ABV38-PC89	T31 ABV38-PC88
ABV37		T8 ABV37-CH11	T20 ABV37-PC89	T32 ABV37-PC88
ABV39		T9 ABV39-CH11	T21 ABV39-PC89	T33 ABV39-PC88
ABV45		T10 ABV45-CH11	T22 ABV45-PC89	T34 ABV45-PC88
ABV25		T11 ABV25-CH11	T23 ABV25-PC89	T35 ABV25-PC88
ABV49		T12 ABV49-CH11	T24 ABV49-PC89	T36 ABV49-PC88

ABV: Actinomiceto Biotecnología Vegetal; PC, CH11: *Phytophthora capsici*.

c) Inoculación de Actinomicetos y *Phytophthora capsici*

Las cajas Petri con PDA se dividieron en cuatro compartimentos para evaluar de manera simultánea cuatro diferentes actinomicetos por caja. La

inoculación de los actinomicetos consistió en colocar discos de micelio de tres mm de diámetro por cepa en cada uno de los cuatro compartimentos en los que fue dividida la caja Petri a un cm de distancia del extremo de la caja (Figura 2). Los discos con micelio de *Phytophthora capsici* se colocaron en el centro de la Caja Petri un día después de la inoculación de los actinomicetos; la edad del micelio inoculado fue de cinco días. El control consistió en colocar únicamente el micelio del patógeno en el centro de la caja Petri.

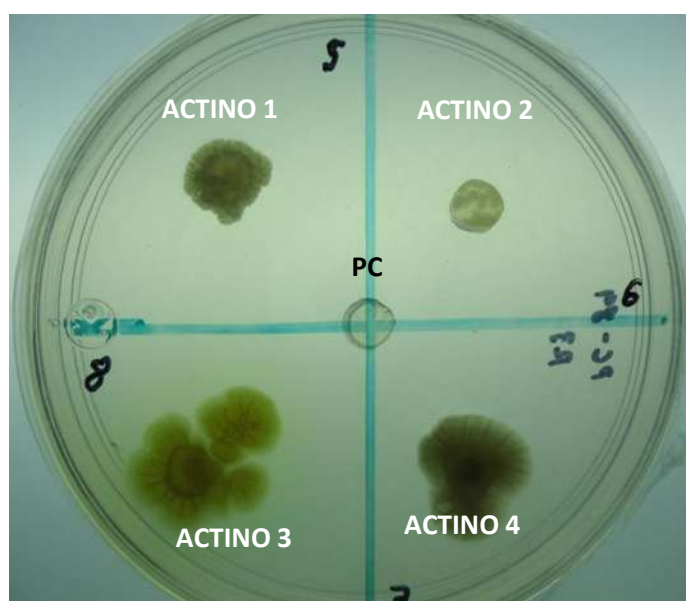


Figura 2. Unidad experimental. En el centro de la caja un disco de micelio de *Phytophthora capsici* (PC), y en los compartimentos un actinomiceto (ACTINO).

d) Determinación de la Inhibición del crecimiento

Una vez que las cajas control en donde el crecimiento del patógeno cubrió por completo la placa de cultivo se procedió a la medición de la inhibición del crecimiento expresado en porcentaje. Esto se realizó mediante el procesamiento de imágenes fotográficas con el Software “ImageJ”. En el software se mide la superficie de crecimiento del control (cuantificada en bytes) y posteriormente el área de inhibición del patógeno por efecto de los actinomicetos (también en bytes); con base en el área del tratamiento control se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la siguiente fórmula de cálculo:

$$IC = \frac{\text{Área en píxeles de la inhibición de cada tratamiento}}{\text{Área en píxeles del crecimiento del control}} (100)$$

Dónde: IC = *Inhibición del crecimiento*

En este ensayo preliminar se tomó en cuenta como área total $\frac{1}{4}$ de la caja Petri correspondiente a cada tratamiento. El porcentaje de inhibición fue analizado estadísticamente mediante un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II.

1.6.5 Ensayo de confrontación dual: Actividad antimicrobiana individual de diferentes cepas de actinomicetos.

Una vez confirmada la capacidad para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora capsici* por parte de las cepas de actinomicetos: AVB02, ABV46 ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49; se desarrolló un ensayo de confrontación dual que consistió en colocar frente a frente una cepa de actinomiceto contra una cepa de *Phytophthora capsici* en condiciones *in vitro*. Esto con la finalidad de determinar la actividad antimicrobiana individual de cada uno de los actinomicetos, debido a que en el ensayo preliminar la capacidad antagónica de un actinomiceto podría enmascarar la actividad de los actinomicetos circundantes por medio de los metabolitos secundarios dispersados en la placa de cultivo.

a) Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial en donde se evaluaron el factor actinomiceto con 12 niveles (AVB02, ABV46 ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49) y *Phytophthora capsici* con dos niveles (CH11 y PC88) generándose 24 tratamientos, más dos control donde únicamente se colocó al fitopatógeno, quedando finalmente 26 tratamientos repetidos cuatro veces cada uno, para un total de 104 unidades experimentales (UE). El arreglo experimental fue completamente al azar. Las UE se incubaron a temperatura constante de 25°C.

b) Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de acuerdo a la fórmula presentada en el apartado 1.6.4.4. Con los datos de inhibición se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II.

c) Montaje del ensayo de confrontación dual

En cajas Petri con PDA se inoculó una cepa de un actinomiceto que fue sembrado mediante estrías a lo largo de un transecto vertical de un centímetro de ancho sobre la superficie del medio de cultivo y a su vez en el centro del transecto fue colocado un disco de micelio del mismo actinomiceto. Las cajas de cultivo fueron incubadas en una cámara a temperatura constante de 25°C. Después de 48 horas fue colocada la cepa de *Phytophthora capsici* a un centímetro del borde de la caja Petri frente a la cepa de actinomiceto (Figura 3). Las UE se incubaron nuevamente a 25°C. Cuando el control cubrió por completo la caja se procedió a medir el porcentaje de inhibición del patógeno. Esto se realizó como se describió en el apartado 1.6.4.4 de éste trabajo. Para este ensayo, se consideró como área total a toda la superficie de la placa de crecimiento del control, debido a que cada confrontación dual abarcaba toda la placa de cultivo.

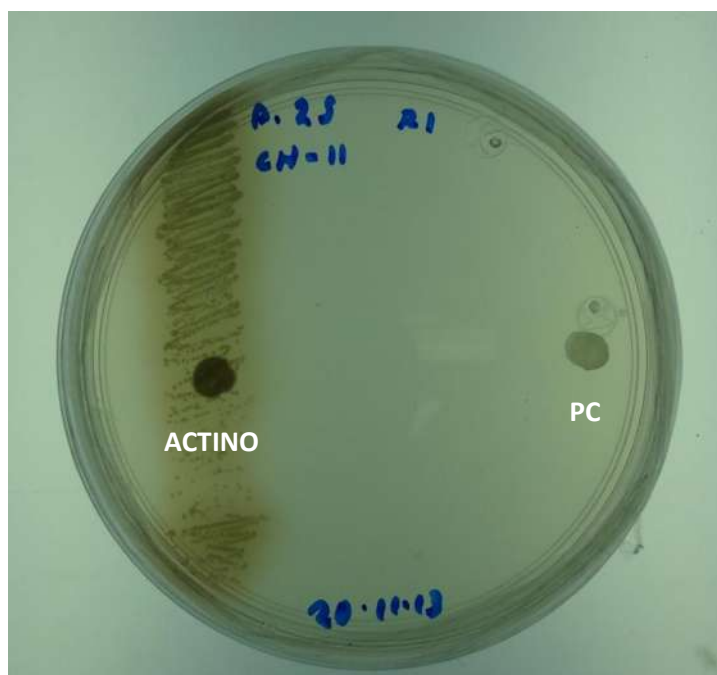


Figura 3. Confrontación dual en caja Petri donde una cepa de actinomiceto (estrías y disco) (ACTINO) fue confrontada a una cepa de *Phytophthora capsici* (PC).

1.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1.7.1 Actinomicetos antagónicos a diferentes cepas de *Phytophthora capsici*

Todas las cepas de actinomicetos mostraron actividad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de las diferentes cepas de *Phytophthora capsici* (Figura 4). La cepa PC89 fue inhibida al 100% (Figura 5). Este patrón se presentó para cada una de las cepas de actinomicetos evaluadas, siendo prácticamente del 100% en todas las UE (Figuras 6,7 y 8). Es posible que éste resultado refleje la alta susceptibilidad de la cepa PC89 a la inhibición por los metabolitos secundarios secretados por los actinomicetos.

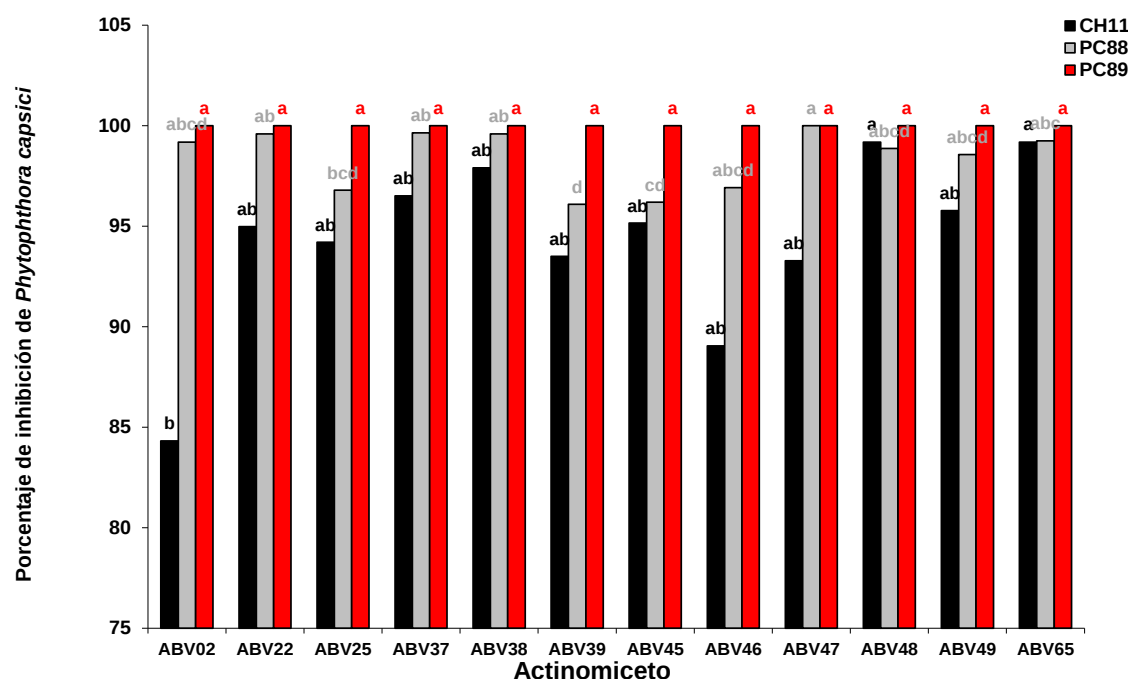


Figura 4. Porcentaje de inhibición de *Phytophthora capsici*. Rojo: PC89, negro: CH11 y gris: PC88. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$) en el mismo color de columna.

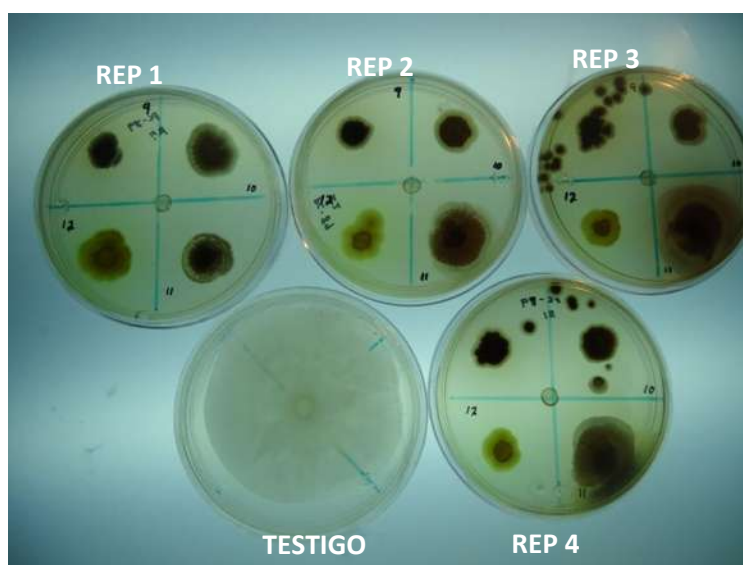


Figura 5. Inhibición del crecimiento de la cepa PC89 por los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49.

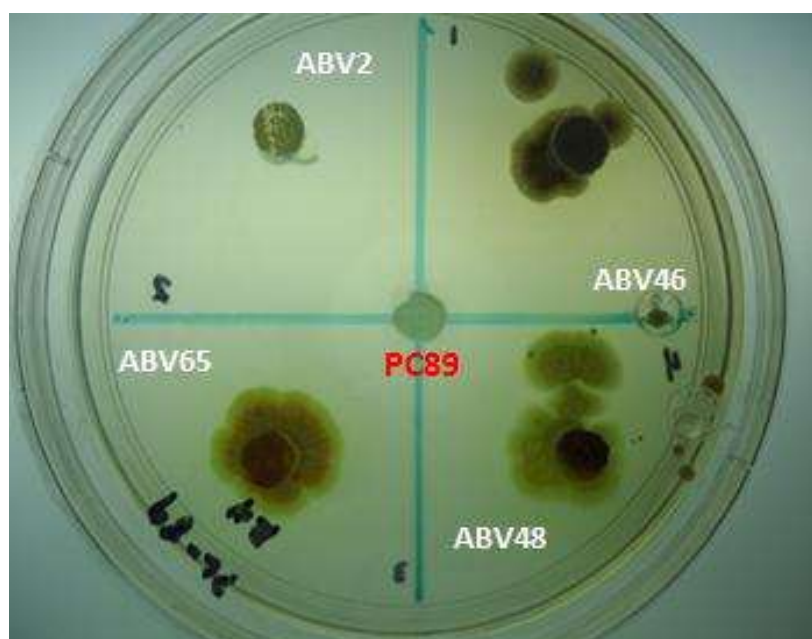


Figura 6. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa PC89 de *Phytophthora capsici* por los actinomicetos: ABV46, ABV02, ABV65 y AVB48.

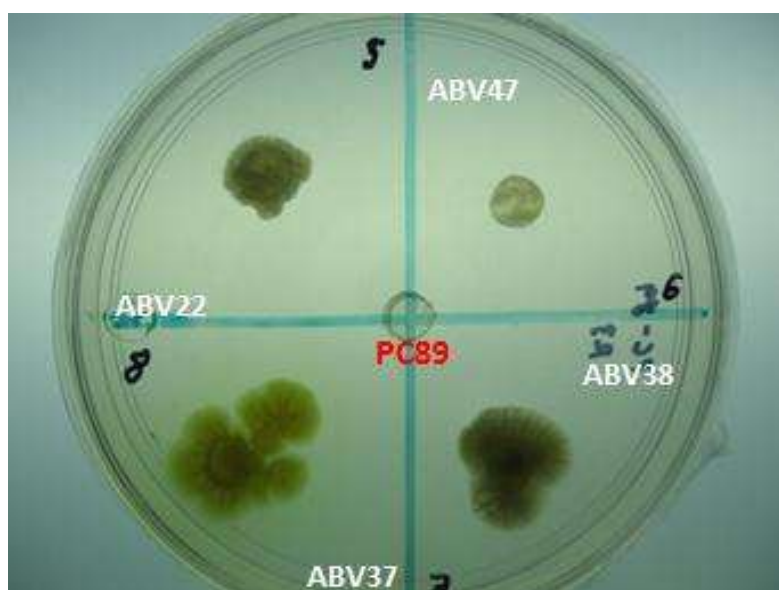


Figura 7. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa PC89 de *Phytophthora capsici* por los actinomicetos: ABV22, ABV47, ABV38 y AVB37.

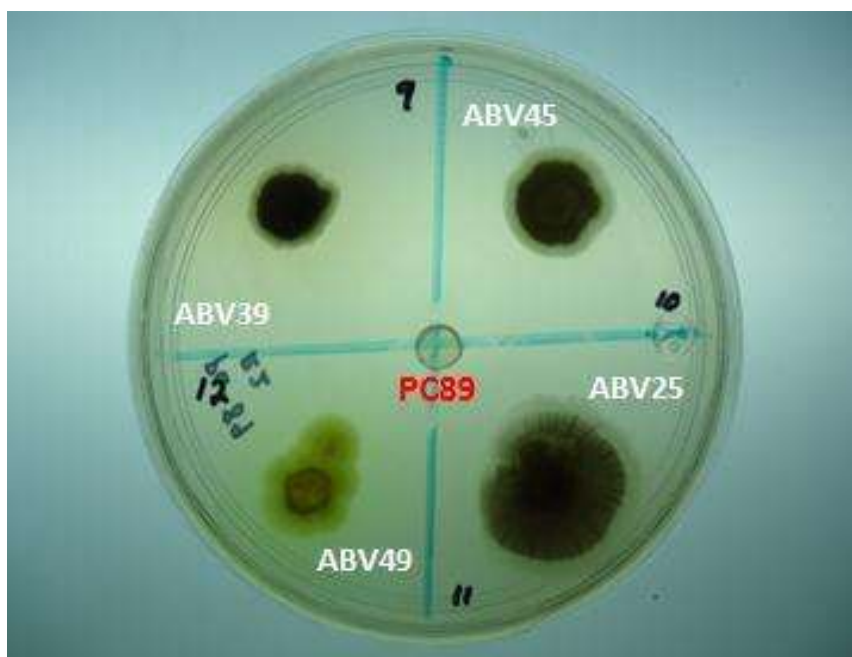


Figura 8. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa PC89 de *Phytophthora capsici* por los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y AVB49.

Los resultados encontrados para la cepa CH11, mostraron una mayor resistencia a la inhibición por actinomicetos junto con la cepa PC88 (Figura 9). Sin embargo, la disminución del crecimiento de ésta cepa respecto al control siguió siendo muy alta en un rango del 84-99%. Solo el actinomiceto ABV02, presentó un menor porcentaje de inhibición con un 84.32%. En la Figura 10 se muestran las UE con los actinomicetos ABV46, ABV2, ABV65 y ABV48, se observa claramente como las cepas ABV65 y ABV48 inhibieron el crecimiento de CH11. Por otro lado, los actinomicetos ABV46 y ABV02 inhibieron en menor grado que los anteriores; sin embargo, también limitaron el crecimiento del fitopatógeno a un área cercana a los metabolitos secundarios que secretan, al no observarse crecimiento en la zona donde cambió de color el medio de cultivo por la presencia del actinomiceto.

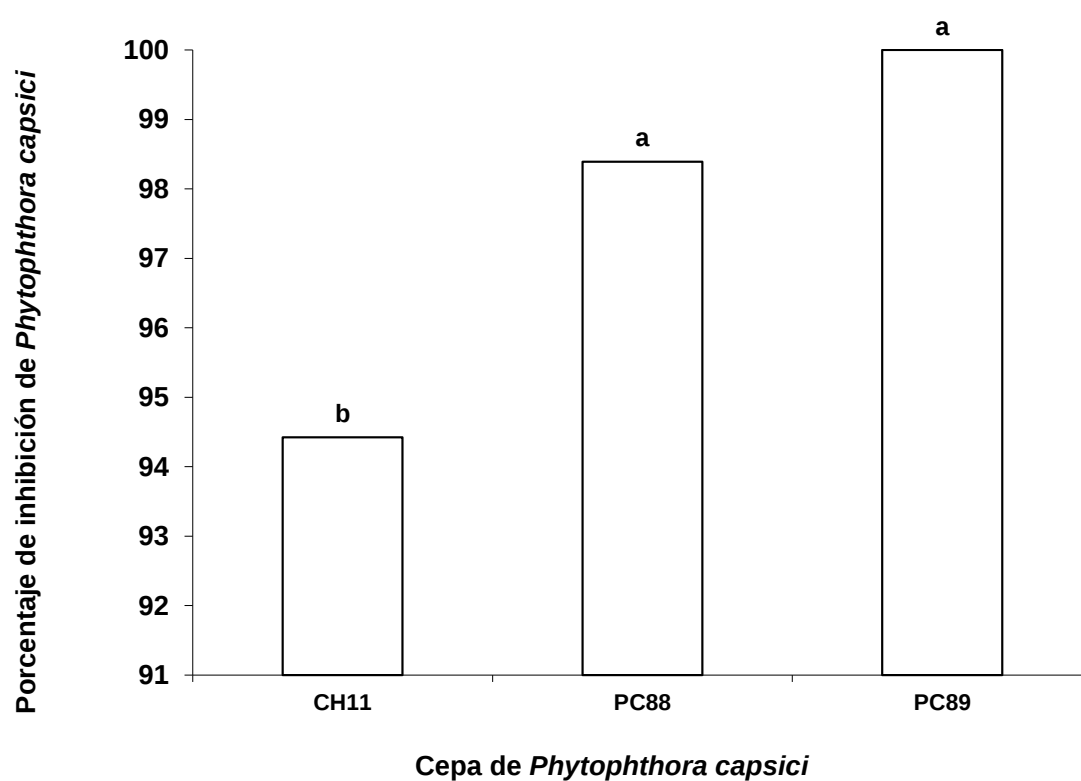


Figura 9. Susceptibilidad de las cepas de *Phytophthora capsici* CH11, PC88 y PC89. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).

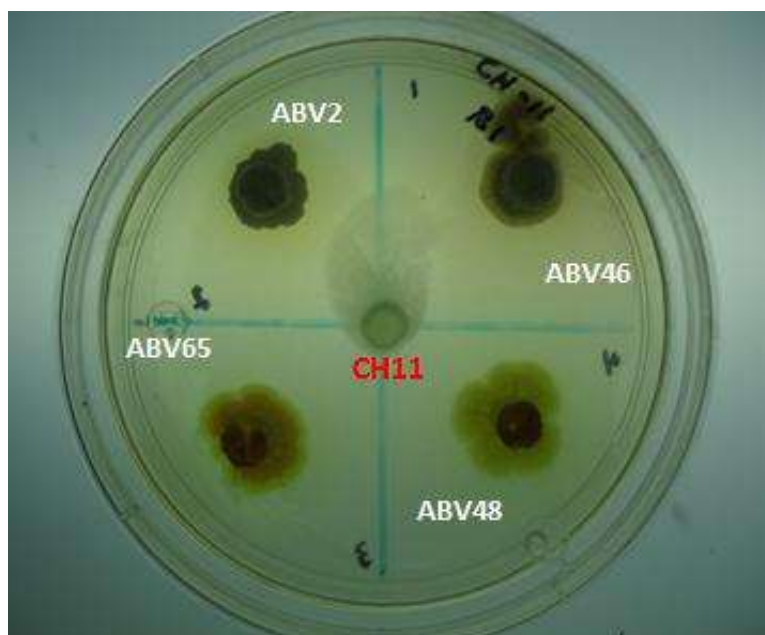


Figura 10. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici* por los actinomicetos: ABV46, ABV02, ABV65 y AVB48.

En la Figura 11, se observa la inhibición del crecimiento por parte de los actinomicetos ABV22, ABV47, ABV38 y ABV37; se observa que estos actinomicetos son capaces de inhibir el crecimiento del fitopatógeno de manera eficiente respecto al control, el cual cubrió por completo la caja al treceavo día después de inoculado en la UE. Sin embargo, al compararlos con la cepa PC89 (Figura 8) la cepa CH11 fue más resistente debido a que logró crecer en el medio de cultivo en presencia de actinomicetos. El mismo comportamiento presentó esta cepa para los actinomicetos ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49 (Figura 12).

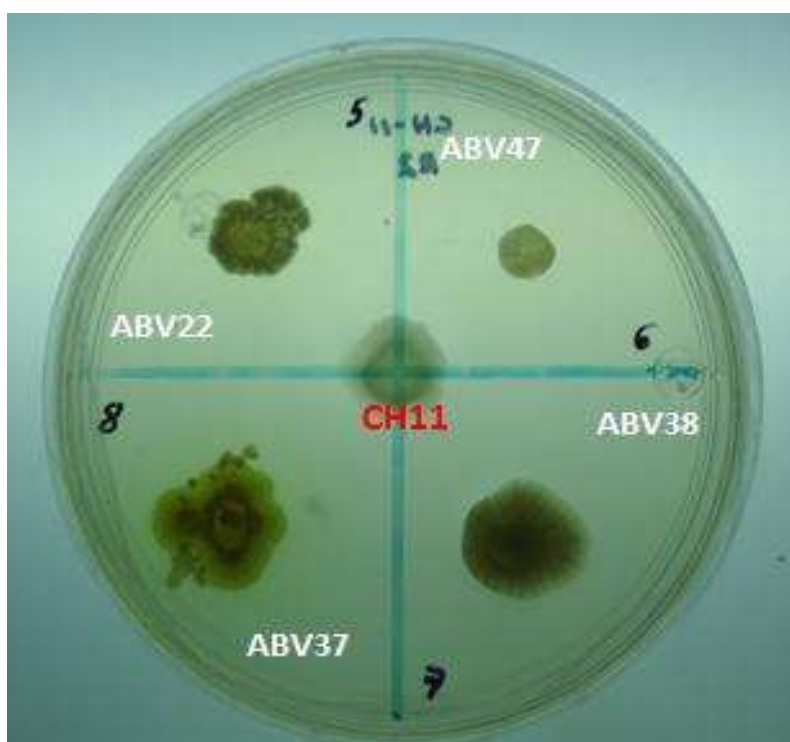


Figura 11. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici* por parte de los actinomicetos: ABV22, ABV47, ABV38 y ABV37.

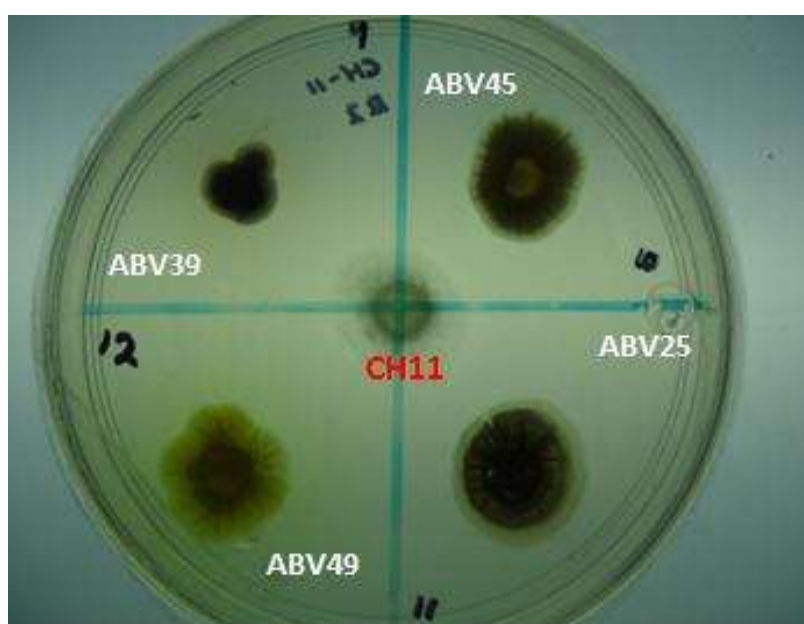


Figura 12. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici* por parte de los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y ABV49.

En la cepa PC88, se observó inhibición por parte de los diferentes actinomicetos, donde la inhibición fue del 96 al 100% respecto al control.

En las Figuras 13, 14 y 15 se presenta la inhibición del crecimiento de la cepa PC88 donde el actinomiceto ABV47 inhibió al 100% el crecimiento del patógeno. Mientras que el actinomiceto ABV45 inhibió un 96%.

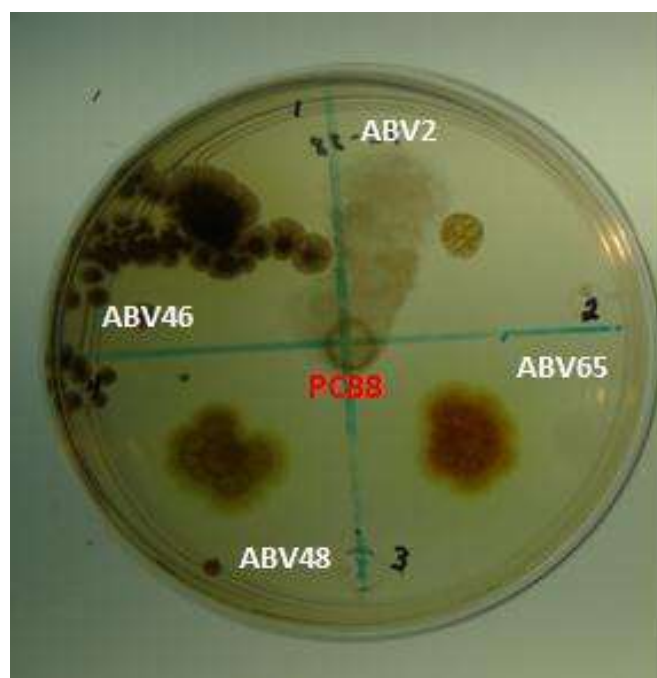


Figura 13. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici* respecto al control por parte de los actinomicetos: ABV46, ABV02, ABV65 y AVB48.

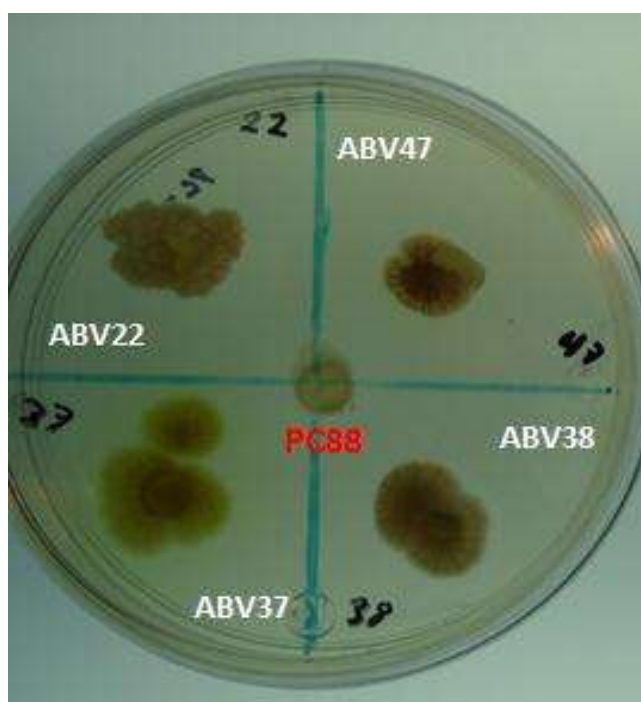


Figura 14. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici* respecto al control por parte de los actinomicetos: ABV22, ABV47, ABV38 y AVB37.

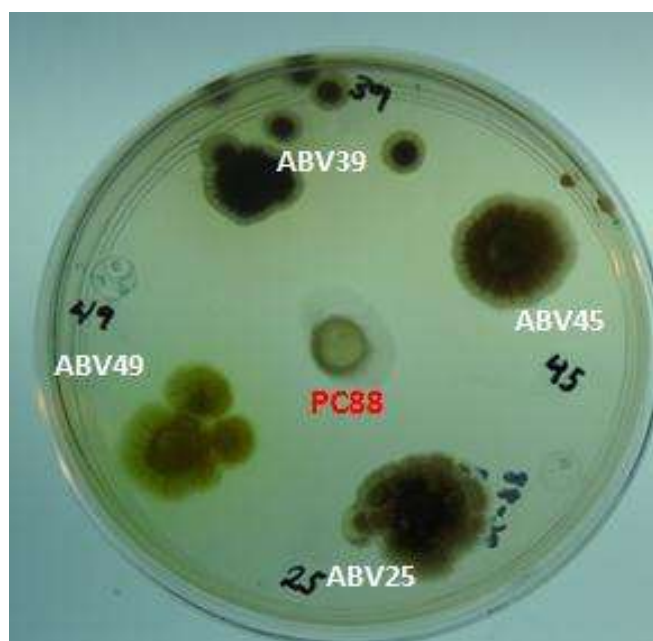


Figura 15. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici* respecto al control por parte de los actinomicetos: ABV39, ABV45, ABV25 y AVB49.

Se observó un alto porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno por efecto de los actinomicetos en un rango del 84 al 100%. Lo que indica que las 12 cepas podrían ser utilizadas en estudios sobre bioprotección en plantas contra *Phytophthora capsici*. Por otro lado, en la Figura 9, se observa que el crecimiento en la cepa PC89 fue inhibido completamente por efecto de los metabolitos secretados por los actinomicetos; lo que muestra que ésta cepa es muy susceptible a éstas bacterias con actividad antimicrobiana. En promedio, el efecto inhibitorio sobre la cepa PC88 fue estadísticamente similar al de PC89 lo que refleja la efectividad antimicrobiana de las diferentes cepas de actinomicetos. La inhibición del crecimiento de la cepa CH11 fue menor que PC88 y PC89 (Tukey ($p < 0.05$), sin embargo el porcentaje de inhibición fue del 94%. El alto grado de control mostrado por los actinomicetos en este ensayo, se debió entre otras cosas a que, fueron preseleccionadas a partir de experimentos de antagonismo contra fitopatógenos, donde se evaluaron 80 cepas aisladas de suelos agaveros de Michoacán y Aguascalientes (Rincón *et al.*, 2014). Estos resultados concuerdan con los reportados por Fonseca-Ardila y colaboradores (2011) quienes a partir de 25 morfotipos aislados de purines de Chipaca (*Bidens pilosa*), obtuvieron ocho que fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Phytophthora infestans in vitro* del 33 al 77%.

En este ensayo preliminar es importante mencionar que se evaluó el grado de inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* en cajas Petri que contenían cuatro cepas de actinomicetos, por lo que el efecto inhibitorio de una cepa era probable que fuera el resultado de la interacción entre ellas en una misma placa de cultivo y no de la cepa individual. Por este motivo se desarrolló un ensayo de confrontación dual donde se evaluó de manera individual, cada actinomiceto contra cada cepa del fitopatógeno con el objetivo de determinar el grado real de inhibición del crecimiento.

1.7.2 Actividad antimicrobiana individual de diferentes cepas de actinomicetos.

En la Figura 16 se presenta el porcentaje de inhibición de las 12 cepas de actinomicetos sobre la cepa CH11 de *Phytophthora capsici*, la cepa ABV39

inhibió el crecimiento del patógeno con un 71% (Figura 17), seguido de ABV38 que obtuvo un porcentaje de inhibición del 63% (Figura 18). La cepa que ejerció la menor inhibición del crecimiento del fitopatógeno fue la AVB49 con un 43% (Figura 19). Es posible que la capacidad antimicrobiana de la cepa ABV39 para inhibir el crecimiento de la cepa CH11 se deba a la competencia por espacio y nutrientes al crecer prácticamente en toda la placa del cultivo (Figura 17). Estos resultados son similares a los encontrados por Ezziyyani y colaboradores (2004), donde al evaluar el actinomiceto *Streptomyces rochei* frente a *Phytophthora capsici* encontraron que inhibió el 81% del crecimiento radial del fitopatógeno tan sólo en cuatro días y en siete días, fue capaz de parasitarlo creciendo sobre él, favorecido por la producción de enzimas degradativas sobre el micelio del fitopatógeno. En otros estudios se han encontrado enzimas β -1,3-, β -1,4-, y β -1,6-glucanasas causando lisis de *Pythium aphanidermatum in vitro* (El-Tarabily, 2006). Evangelista-Martínez en 2014 al utilizar diferentes cepas de *Streptomyces sp* estas lograron inhibir en promedio 90.2% a *Phytophthora capsici* lo que refleja la actividad antimicrobiana de ciertas cepas o aislados contra éste oomycete.

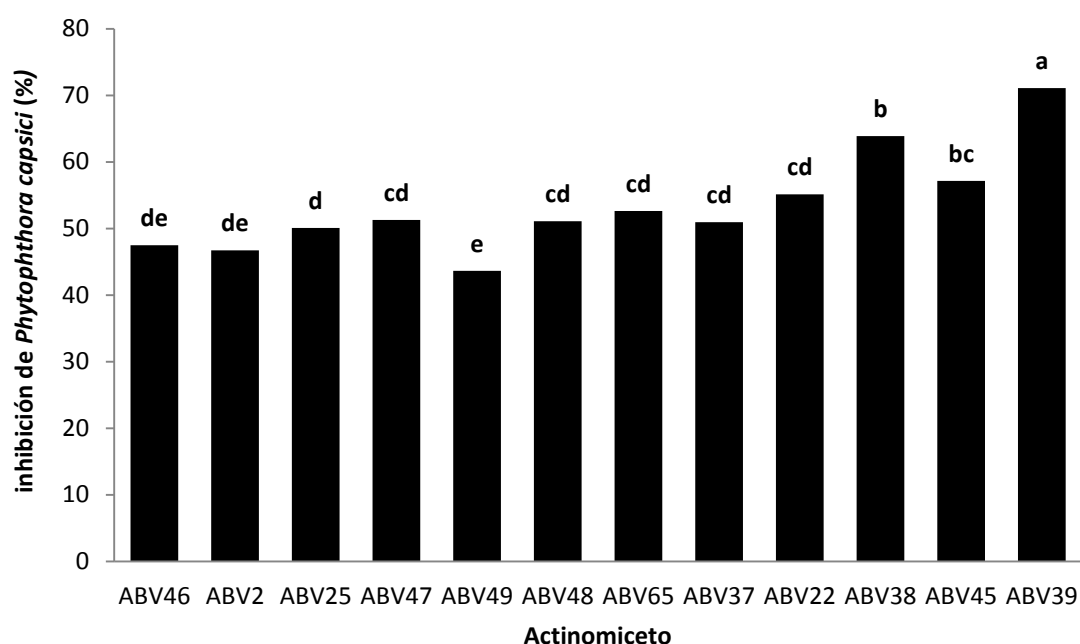


Figura 16. Inhibición del crecimiento *in vitro* de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici* por cepas de actinomicetos. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).

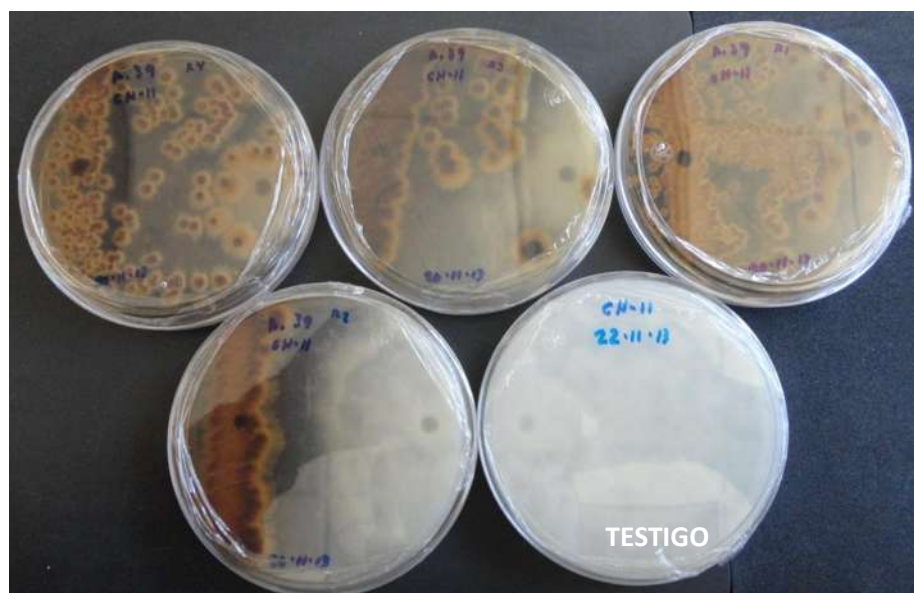


Figura 17. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV39 sobre el crecimiento de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

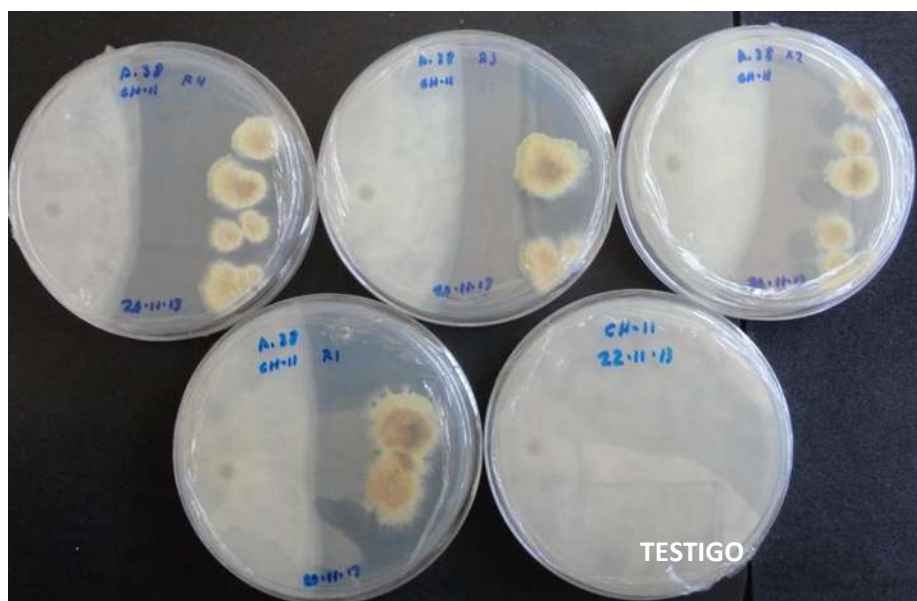


Figura 18. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV38 sobre el crecimiento de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

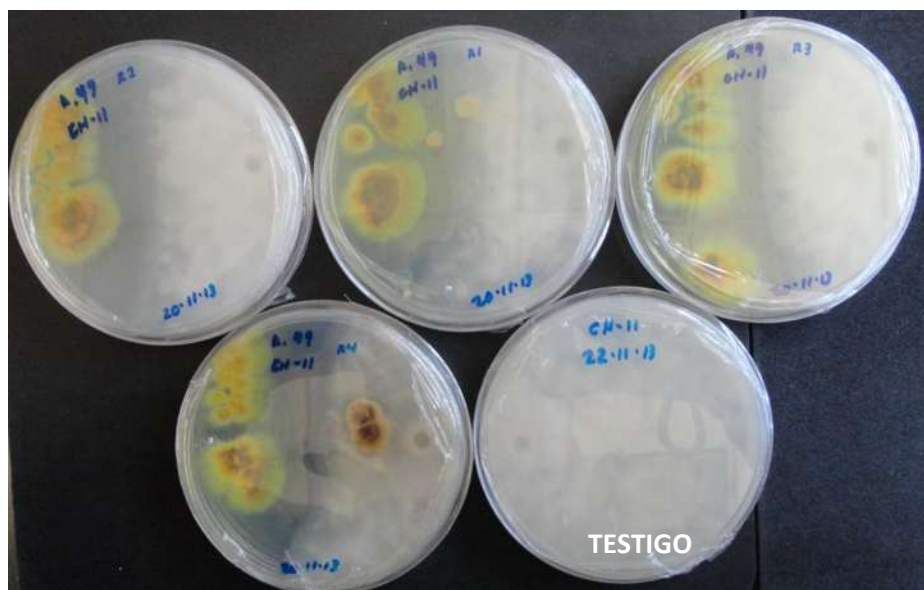


Figura 19. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV49 sobre el crecimiento de la cepa CH11 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

Por otro lado, para la cepa PC88 de *Phytophthora capsici*, los actinomicetos ejercieron una mayor inhibición sobre el crecimiento del patógeno respecto al encontrado en la cepa CH11, lo que evidencia una mayor susceptibilidad de esta cepa a la presencia de actinomicetos con propiedades

antimicrobianas (Figura 20). El actinomiceto ABV39 fue nuevamente el mejor al inhibir en 86% el crecimiento de PC88 (Figura 21), seguido de ABV45 con 73% (Figura 22) y ABV38 con 69% (Figura 23). En este caso la cepa ABV25 presentó el menor efecto inhibitorio con 45% (Figura 24). Como se observa en la Figura 17, el actinomiceto ABV39 es capaz de competir con *Phytophthora capsici* por espacio y nutrientes logrando crecer inclusive sobre el micelio de éste último, lo que, refuerza la capacidad parasitaria de algunos actinomicetos sobre agentes fitopatógenos (Ezziyyani *et al.*, 2004). La actividad antimicrobiana reflejada en los altos porcentajes de inhibición de las cepas ABV45 y ABV38 sobre PC88 (Figuras 22 y 23) es posible que sea efecto de la producción de metabolitos secundarios, específicamente antibióticos, pues la secreción de éstos en la placa de cultivo hace que el fitopatógeno no sea capaz de crecer. Existen diversos trabajos que reportan la actividad antimicrobiana de actinomicetos sobre agentes fitopatógenos por medio de la secreción de antibióticos, Dávila-Medina y colaboradores (2013), encontraron que varias cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos y larvas de hormigas del estado de Coahuila, inhibieron en un rango del 49.63 al 61.57% a los hongos fitopatógenos *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Colletotrichum* sp. en experimentos de confrontación *in vitro*.

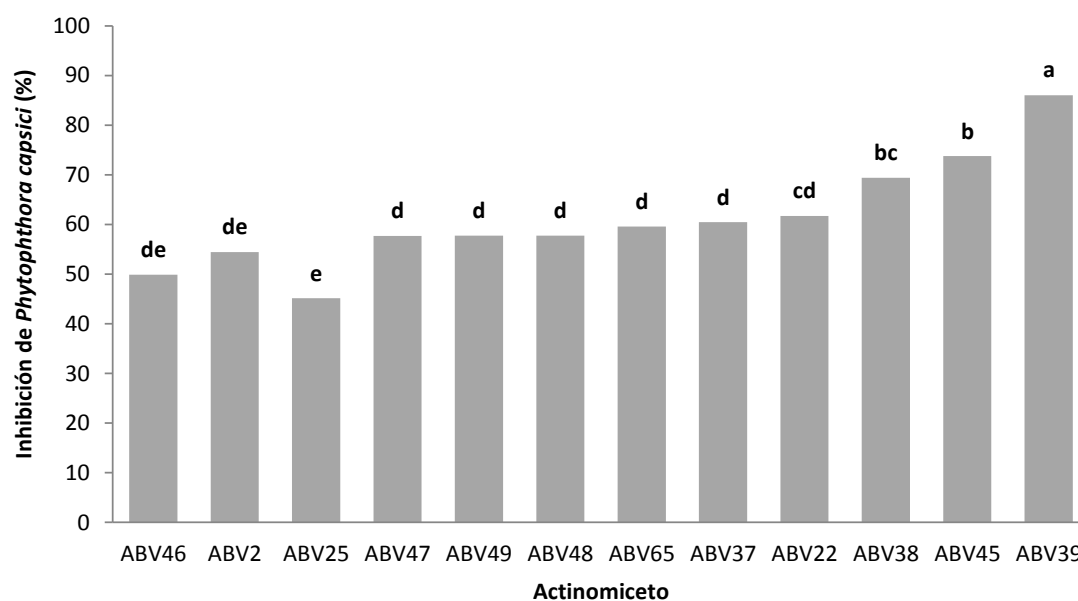


Figura 20. Inhibición del crecimiento de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici* por actinomicetos. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).

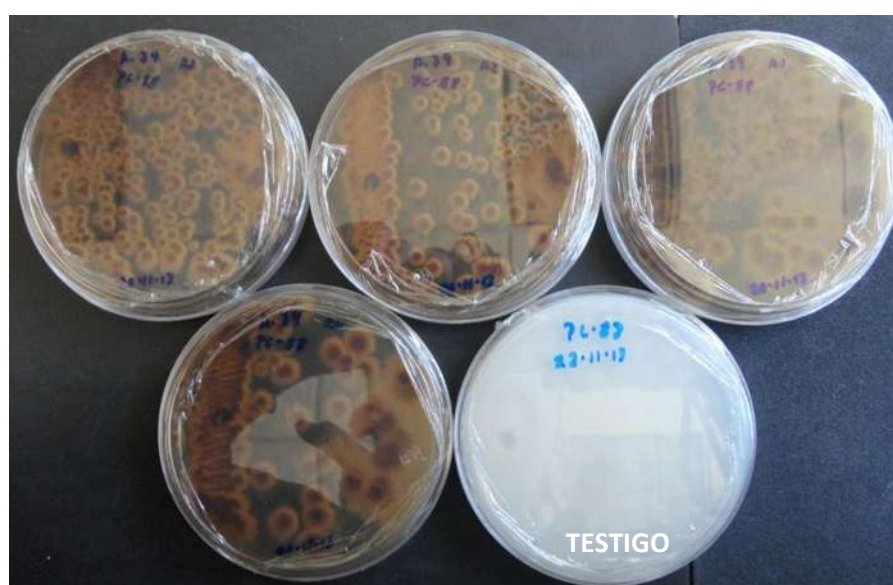


Figura 21. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV39 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

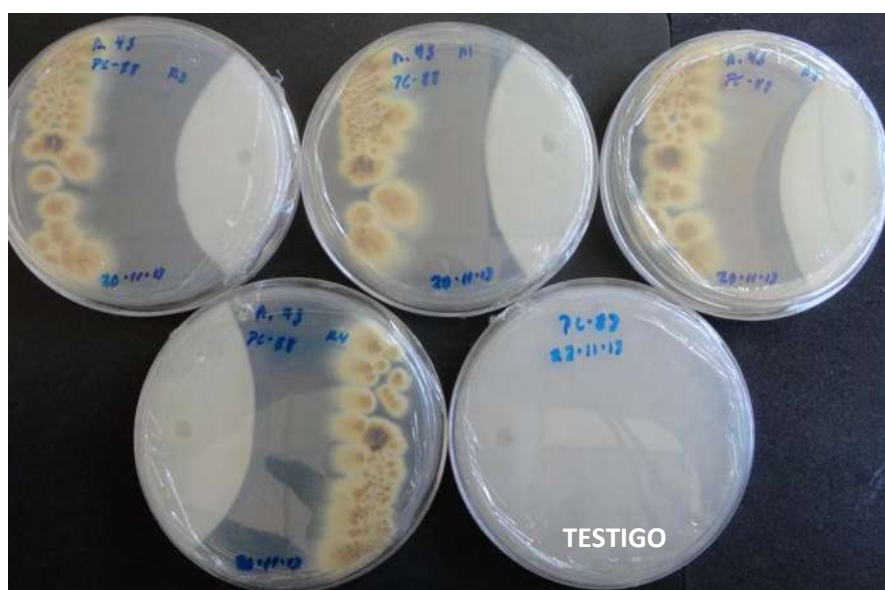


Figura 22. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV45 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

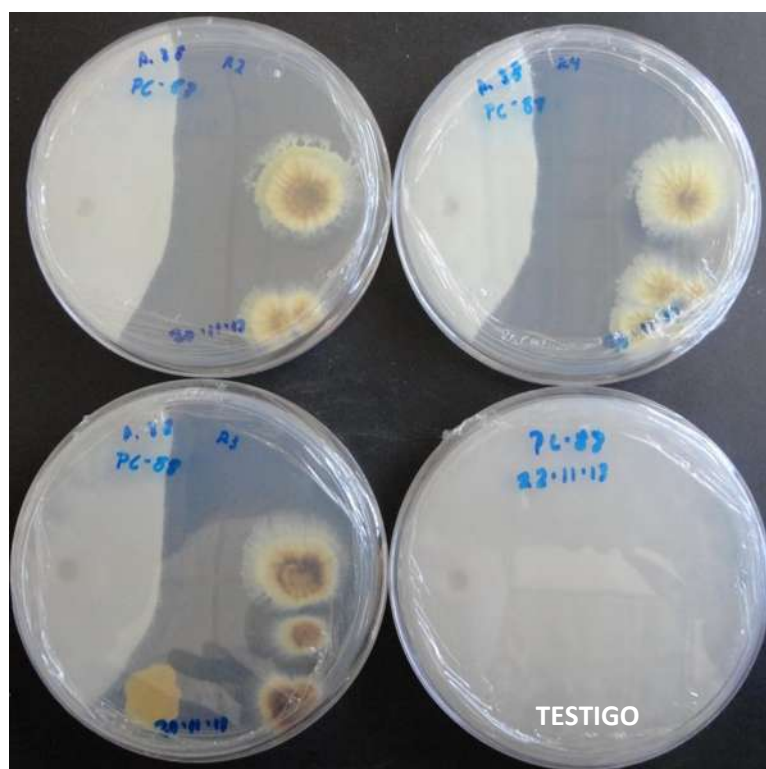


Figura 23. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV38 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

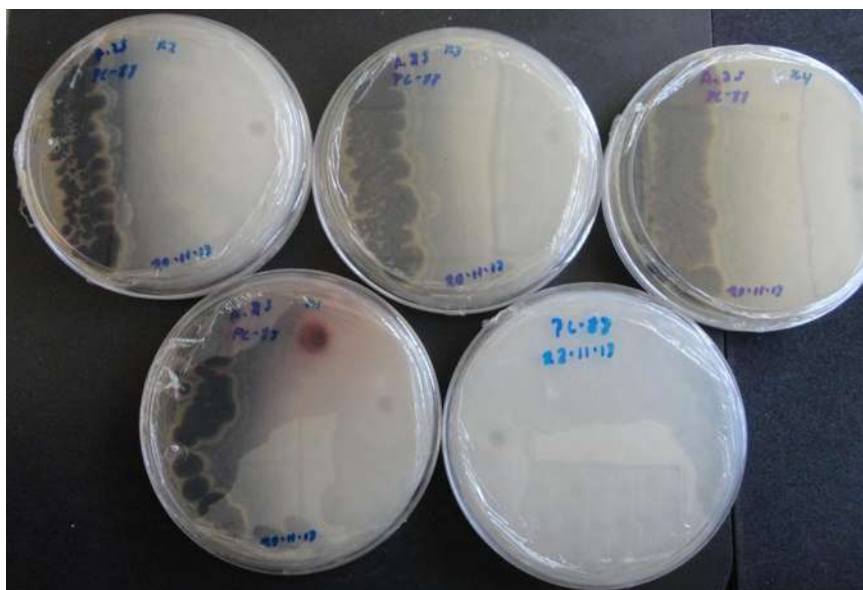


Figura 24. Actividad inhibitoria del actinomiceto ABV25 sobre el crecimiento de la cepa PC88 de *Phytophthora capsici*. Testigo = sin actinomiceto.

Finalmente, al comparar los 12 actinomicetos contra las dos cepas de *Phytophthora capsici* CH11 y PC88 (Figura 25), se observó que los actinomicetos con una mayor actividad antimicrobiana sobre la cepa CH11 (ABV39, ABV45 y ABV38) son también los que presentan una mayor inhibición sobre la cepa PC88 y la proporción es similar en el resto de los tratamientos. Esto refleja una afinidad para inhibir esta especie de *Phytophthora* independientemente de la cepa del patógeno, por lo que podrían ser un recurso importante en el control biológico de la marchitez del chile. Sin embargo, algunos autores sugieren que es necesario realizar estudios posteriores *in planta* para evaluar su efecto protector en condiciones de invernadero o campo (Medina-Cuevas y Evangelista-Martínez, 2011). En éste punto cobra interés no sólo el control directo del patógeno, sino también el efecto indirecto al inducir la producción de compuestos antimicrobianos por la planta, como fitoalexinas producidas a partir de la inducción de resistencia sistémica (Hemant *et al.*, 2011).

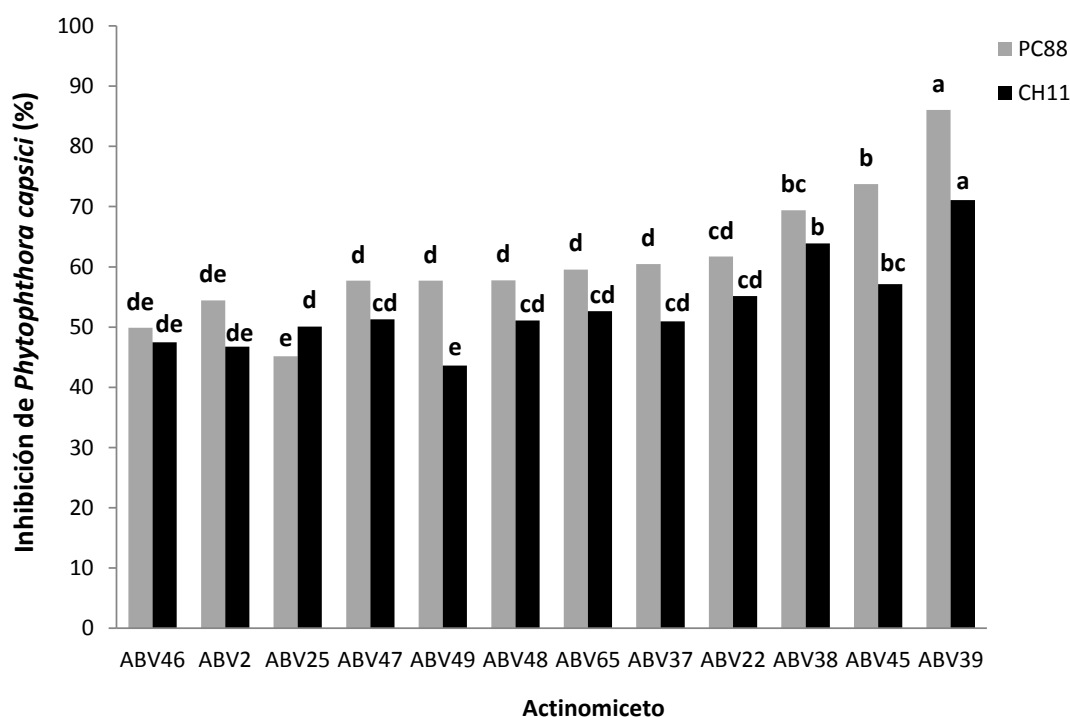


Figura 25. Inhibición del crecimiento por cepas de actinomicetos sobre las cepas CH11 y PC88 de *Phytophthora capsici*. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticamente significativas según Tukey ($p < 0.05$).

1.8 CONCLUSIONES

Los 12 diferentes actinomicetos mostraron un efecto antagónico al inhibir el crecimiento de las cepas de *Phytophthora capsici* contra las cuales fueron evaluadas. La cepa PC89 no logró crecer en el medio de cultivo con presencia de actinomicetos por lo que fue 100% inhibida, la cepa PC88 fue controlada en un 98%, mientras que la cepa CH11 en un 94%. De manera general todos los actinomicetos fueron altamente eficaces, sin embargo fue necesaria la evaluación individual de cada cepa en un ensayo de confrontación dual *in vitro* para determinar el grado real de inhibición del crecimiento del fitopatógeno. En éste ensayo se encontró que los diferentes actinomicetos evaluados lograron inhibir en distinta proporción el crecimiento de las cepas CH11 y PC88 de *Phytophthora capsici*, resultando el actinomiceto ABV39 como el más eficiente en ambos casos con una inhibición del 71 y 86% respectivamente. El actinomiceto ABV38 inhibió el crecimiento del fitopatógeno en un 63 y 69% respectivamente, y la cepa ABV45 inhibió el 53% a CH11 y 73% a PC88. Estos

actinomicetos podrían ser aplicados como agentes de control biológico contra *Phytophthora capsici* en experimentos posteriores bajo condiciones *in planta*.

1.9 LITERATURA CITADA

Abdel-Moneim. 2006. Induction of systemic acquired resistance in cucumber plant against cucumber mosaic cucumovirus by local *Streptomyces* strain. Plant Pathology 5: 343-349.

Castillo E. C. 2004. Efectividad de actinomicetos aislados de la rizósfera de papa sobre *Rhizoctonia solani* kühn in vitro. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 203-207.

Dávila-Medina M. D., G. Gallegos-Morales, F. D. Hernández-Castillo, Y. M. Ochoa-Fuente y A. Flores-Olivas. Actinomicetos antagonicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4: 1187-1196.

El-Tarabily K. A. 2006. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. Canadian Journal of Botany 84: 211–222.

Evangelista-Martínez Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30: 1639-1647

Evangelista-Martínez, Z. 2014. Preliminary study on some actinomycetes and evaluation of their potential antagonism against fungal pathogens. British Microbiology Research Journal 4: 272-281.

Ezziyyani M., C. Pérez-Sánchez, M. A. Requena, L. Rubio y M. E. Candela. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 26: 69-78.

- Franco-Correa M. 2008. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM <http://sisbib.unmsm.edu.pe>. (Accesada, 25 Octubre, 2012).
- Fonseca-Ardila Y. A., D. E. Castellanos-Suárez, y T. E. León-Sicard. 2011. Efecto antagónico *in vitro* de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) Frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Revista de la Facultad Nacional Agrícola de Medellín 64: 6111-6119.
- Hemant J. P., K. S. Alok, P. S. Dhananjaya, L. C. Bhushan, and K. A. Dilip. 2011. Actinomycetes mediated biochemical responses in tomato (*Solanum lycopersicum*) enhances bioprotection against *Rhizoctonia solani*. Crop protection 30: 1269-1273.
- Medina-Cuevas H. L. y Z. Evangelista-Martínez. 2010. Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. Unacar Tecnociencia 5: 72-78.
- Reyes-Ramírez A., J. Cristóbal-Alejo, E. Ruiz-Sánchez y J. M. Tun-Suárez. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium sp* aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas. Fitosanidad 16: 161-165.
- Sánchez-Ovalle M.A., S. R. Sánchez-Peña, G. Gallegos-Morales y A. Sánchez-Arizpe. 2011. Actividad inhibitoria de actinomicetos aislados de hormigas cultivadoras de hongos (Hymenoptera: Formicidae) sobre *Colletotrichum lindemuthianum* y *Rhizoctonia solani*. Revista Agraria Nueva Época 8: 14-17.
- Xiao K., L. L. Kinkel and D. A. Samac. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. Biological Control 23: 285–295.
- Xuan-Joa N., N. Kiaw-Wai, L. Young-Seong, T. Hamisi, L. Geon-Hyoung, J. Byoung-Kon, R. Hee-Myeong, K. Sang-Jun, J. Woo-Jin and K Kil-Young.

2012. Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in Pepper. Plant Pathology 28: 282-289.

CAPÍTULO 2

ANTAGONISMO O COMPATIBILIDAD ENTRE DISTINTOS ACTINOMICETOS

2.1 RESUMEN

El empleo de actinomicetos como agentes de biocontrol de fitopatógenos requiere de conocimientos sobre la compatibilidad entre cepas para determinar su posible aplicación conjunta y así potencializar su efecto. Los actinomicetos como productores de compuestos antimicrobianos, podrían inhibirse entre ellos al ser aplicados de forma combinada. Por lo que el objetivo de este trabajo fue, evaluar el posible antagonismo entre distintas cepas de actinomicetos, que presentan actividad inhibitoria contra *Phytophthora capsici* con el fin de determinar combinaciones compatibles para su uso *in planta*. Por lo cual se realizó un ensayo de confrontación dual bajo un diseño experimental completamente al azar, confrontándose 13 cepas de actinomicetos (cada cepa con las 12 restantes), obteniéndose un total de 78 combinaciones con tres repeticiones. Las cepas evaluadas fueron: AVB02, ABV46 ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25, ABV49 y una cepa comercial a base de *Streptomyces lydicus* (AV). Para medir la compatibilidad o antagonismo entre los diferentes actinomicetos se propuso una escala ordinal de inhibición del crecimiento, que contempla seis niveles, del cero (ausencia de inhibición) al cinco (inhibición completa) de una cepa sobre otra. La inhibición del crecimiento entre las cepas confrontadas, se midió a los 21 días después de establecido el ensayo. Las combinaciones ABV: 65-48, 65-49, 65-37, 48-49, 37-49, 45-25, 02-22, 02-39, 02-AV, 46-39 y 22-AV no presentaron inhibición. Las combinaciones ABV47-39, ABV38-39 y ABV65-25 presentaron un alto nivel de inhibición (cuatro a cinco), por lo que no son recomendables para el desarrollo de formulaciones. La combinación ABV 02-39 resultaría ser la más apropiada para su utilización en experimentos de biocontrol de fitopatógenos *in planta* debido a que no se inhiben entre sí. Ambas tienen buena capacidad para esporular lo que facilita su aplicación, además de que tener a la cepa ABV39 que inhibió al 100% el crecimiento de *Phytophthora capsici in vitro*.

2.2 ABSTRACT

The use of actinomycetes as biocontrol agents of plant pathogens requires knowledge, about the compatibility of strains for their possible combined application and thus potentiates its effect. The actinomycetes as producers of antimicrobial compounds could be inhibited between them when applied in combination. So the aim of this study was to evaluate the possible antagonism between, the different actinomycetes strains f, that have inhibitory activity against *Phytophthora capsici*, to determine compatible combinations for its use *in planta*. For this, an assay of dual confrontation under a completely randomized experimental design was performed, confronting 13 actinomycete strains (each strain with the remaining 12), obtaining a total of 78 combinations with three replications. The strains evaluated were: AVB02, ABV46 ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25, ABV49 and a commercial strain of *Streptomyces lydicus* (AV). To measure antagonism or compatibility between different actinomycetes and growth inhibition ordinal scale was proposed, which includes six levels, from zero (no inhibition) to five (complete inhibition) of a strain over other. Growth inhibition between strains confronted was measured at 21 days after establishment. The combinations ABV: 65-48, 65-49, 65-37, 48-49, 37-49, 45-25, 02-22, 02-39, 02-AV, 22-AV and 46-39 showed no inhibition. The combinations ABV47-39, ABV65-25 and ABV38-39 showed a high level of inhibition (four or five); therefore they are not recommended for formulation development. The ABV02-39 combination would be most appropriate for use in experiments in biocontrol of plant pathogens because they do not inhibit each other. Both have good ability to sporulate which facilitates its implementation, in addition to the ABV39 strain showed a better inhibitory effect against *Phytophthora capsici*.

2.3 INTRODUCCIÓN

Los actinomicetos se caracterizan por producir diversos antibióticos y enzimas capaces de inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Medina-Cuevas y Evangelista-Martínez, 2011), incluso pueden afectar el desarrollo de otras especies y/o cepas de actinomicetos. Es por ello que en el biocontrol de enfermedades de plantas dentro del marco de la agricultura sostenible la aplicación conjunta de dos o más cepas de actinomicetos en

formulaciones líquidas o sólidas resulta ser una alternativa para el control de enfermedades. Sin embargo, la aplicación conjunta de dos o más cepas de actinomicetos, podría tener un efecto antagónico entre ellas y suprimir su efecto bioprotector al ser utilizadas en el control biológico de microorganismos fitopatógenos. Existen estudios que reportan la aplicación individual de actinomicetos en formulación líquida, en polvo y en perlas de alginato de calcio, para controlar la enfermedades en plántulas de tomate (Sabaratnam y Traquair, 2002). En estos, se han encontrado buenos niveles de reducción de la severidad de la enfermedad al ser aplicados monoespecíficamente. Debido a las pocas formulaciones de actinomicetos existentes las cuales contienen una cepa se corre el riesgo de que ésta no tenga un amplio espectro de acción y podría no ser efectiva en el control de distintas enfermedades de la raíz o en el control de consorcios fitopatogénicos como el caso de la marchitez del chile. Por este motivo se requiere determinar el nivel de antagonismo o compatibilidad entre las 12 cepas de actinomicetos estudiadas en el capítulo anterior para la búsqueda de posibles aplicaciones combinadas entre diferentes cepas en busca de un efecto sinérgico para combatir las enfermedades de plantas (Cano, 2011).

Por lo anterior, se diseñó un experimento de confrontación dual entre 12 cepas de actinomicetos: ABV46, ABV2, ABV65, ABV48, ABV22, ABV47, ABV38, ABV37, ABV39, ABV45, ABV25, y ABV49 (cepas con actividad inhibitoria contra *Phytophthora capsici*) más una cepa comercial: *Streptomyces lydicus* denominada Actinovate (AV) con el objetivo de determinar el grado de antagonismo o compatibilidad. Mediante una escala ordinal de inhibición del crecimiento, se seleccionaron dos cepas de actinomicetos con potencial para su aplicación conjunta o individual *in planta*.

2.4 HIPÓTESIS

Los actinomicetos con actividad antimicrobiana pueden tener relaciones de antagonismo entre ellos.

2.5 OBJETIVOS

- Definir una escala ordinal de inhibición del crecimiento entre diferentes cepas de actinomicetos.

- Evaluar la compatibilidad o antagonismo entre las cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana.
- Determinar las mejores combinaciones entre actinomicetos en base a la compatibilidad entre ellos.
- Definir una combinación para su aplicación posterior en experimentos de biocontrol *in planta* contra *Phytophthora capsici*.

2.6 MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de actinomicetos con las que se trabajó en este capítulo son las mismas que se presentan en el apartado 1.6.1 de ésta tesis. La cepa comercial (*Streptomyces lydicus*) fue proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

2.6.1 Diseño experimental

Se realizó un experimento en cultivo *in vitro* de confrontación dual bajo un diseño experimental completamente al azar. Se confrontaron las 13 cepas de actinomicetos (cada cepa con las doce restantes), obteniéndose un total de 78 combinaciones (Cuadro 2) con cinco repeticiones más los controles con tres repeticiones para un total de 429 unidades experimentales (UE). La UE fue una caja Petri. Los controles consistieron en cultivos sólo con la cepa individual de actinomiceto con el fin de verificar su viabilidad y crecimiento.

Cuadro 2. Esquema de combinaciones de confrontación dual *in vitro* entre cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana.

65-48	48-47	47-37	37-45	45-49	49-46	46-2	2-22	22-38	38-39	39-25	25-AV
65-47	48-37	47-45	37-49	45-46	49-2	46-22	2-38	22-39	38-25	39-AV	
65-37	48-45	47-49	37-46	45-2	49-22	46-38	2-39	22-25	38-AV		
65-45	48-49	47-46	37-2	45-22	49-38	46-39	2-25	22-AV			
65-49	48-46	47-2	37-22	45-38	49-39	46-25	2-AV				
65-46	48-2	47-22	37-38	45-39	49-25	46-AV					
65-2	48-22	47-38	37-39	45-25	49-AV						
65-22	48-38	47-39	37-25	45-AV							
65-38	48-39	47-25	37-AV								
65-39	48-25	47-AV									
65-25	48-AV										
65-AV											

La confrontación se llevó a cabo colocando discos de micelio de 3 mm a una distancia de un centímetro entre las combinaciones (Figura 26). El medio de cultivo fue PDA y se ajustó a pH 7. La inhibición del crecimiento de una cepa sobre otra, se midió a los 21 días después de establecido el experimento en base a la escala ordinal de inhibición del crecimiento. El experimento se incubó a 25°C.

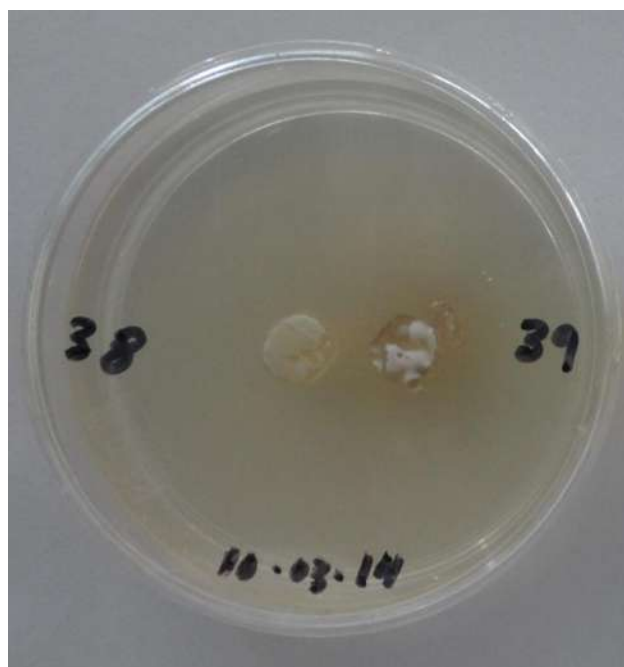


Figura 26. Vista general del diseño de confrontación dual *in vitro* entre cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana.

2.6.2 Análisis estadístico

Con el fin de definir la relación de antagonismo o compatibilidad entre las cepas de actinomicetos se propuso una escala ordinal de cuantificación del grado de inhibición del crecimiento entre las cepas de actinomicetos. Los datos de esta escala fueron analizados aplicando la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis con el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV.II. Con el fin de determinar las diferencias entre las medianas de los tratamientos, se realizó la prueba no paramétrica de comparación de medianas de Duun ($p < 0.05$).

2.6.3 Escala ordinal de inhibición entre actinomicetos

Para medir la compatibilidad o el antagonismo entre los diferentes actinomicetos se propuso una escala ordinal de inhibición del crecimiento, contemplando niveles de cero (ausencia de inhibición) a cinco (inhibición completa) de una cepa sobre otra (Figura 27).

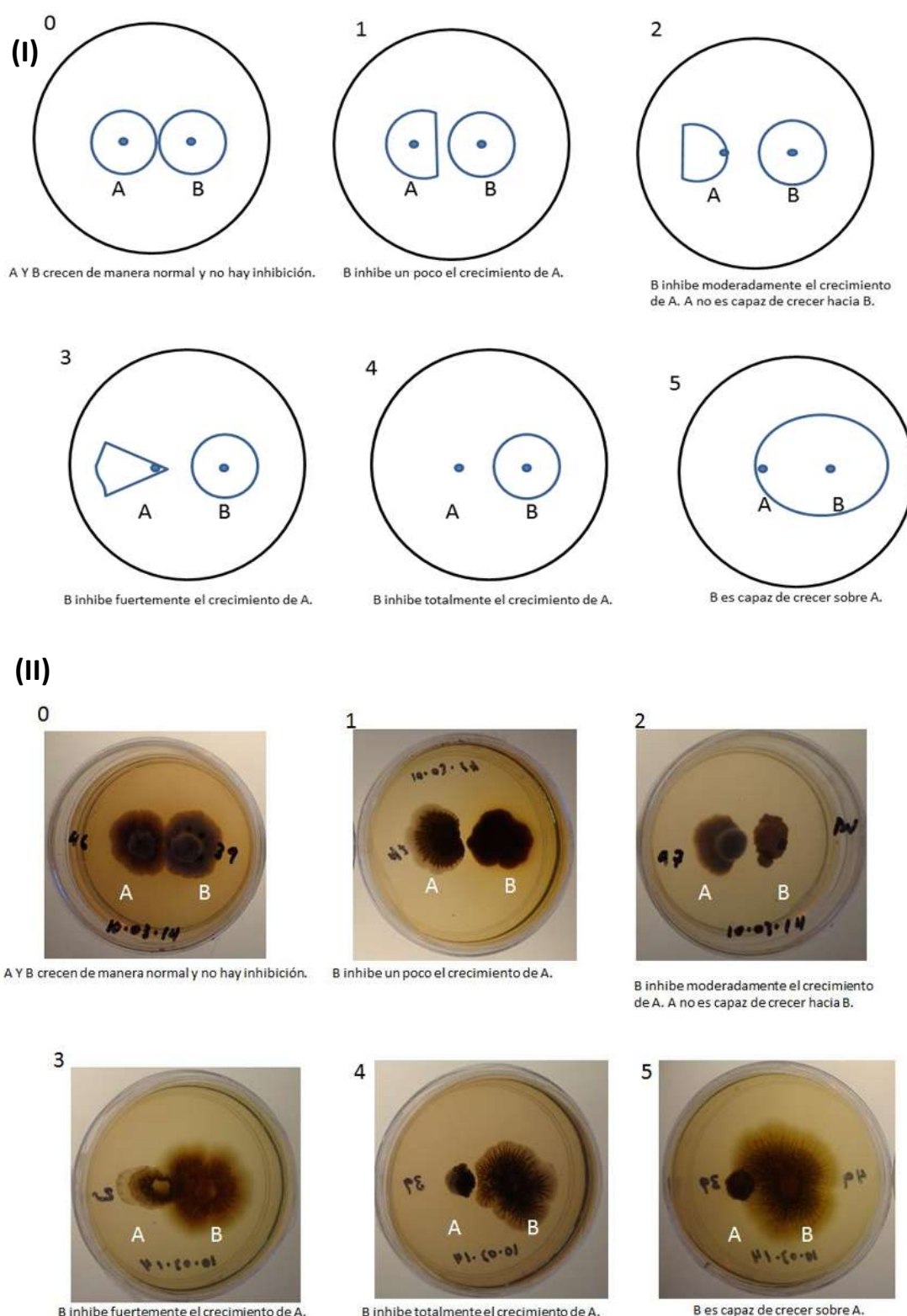


Figura 27. Escala ordinal de inhibición entre actinomicetos. (I) representación de manera esquemática de la escala cualitativa de inhibición del crecimiento entre las cepas de actinomicetos. (II) representación *in vitro* de la escala cualitativa de inhibición del crecimiento entre las cepas de actinomicetos.

2.6.4 Conservación de actinomicetos y *Phytophthora capsici*

Es importante la conservación de las diferentes cepas de actinomicetos y *Phytophthora capsici* por periodos de tiempo prolongados (meses o años) para mantener estos recursos microbiológicos que podrían ser utilizados nuevamente en experimentos futuros. A continuación se describe un método de crioconservación de esporas actinomicetos y un método de almacenamiento de *Phytophthora capsici*.

2.6.5 Crioconservación de actinomicetos

Los cultivos de actinomicetos se crecieron en un medio preferencial que facilita la esporulación de los actinomicetos, éste medio se denomina agar ISP2 el cual está compuesto principalmente por: peptona, extracto de levadura, glucosa y agar al 2% (Franco-Correa *et al.*, 2010). Los cultivos se mantuvieron a 28 °C durante 20 días, las cajas se sellaron con cinta micropore para favorecer una mejor ventilación y a su vez inducir la esporulación de las cepas. Posteriormente se agregaron 10 mL de agua destilada estéril a las placas de cultivo, se rasparon las colonias y se obtuvo una suspensión que contenía una mezcla de esporas, micelio y residuos de las colonias de crecimiento. Esta suspensión se extrajo del cultivo y se transfirió a un dispositivo para filtrado de esporas el cual consistió de una punta para micropipeta de 10 mL con algodón estéril en el centro, la punta a su vez, estaba en la boquilla de un tubo de Falcon de 15 mL (Figura 28).

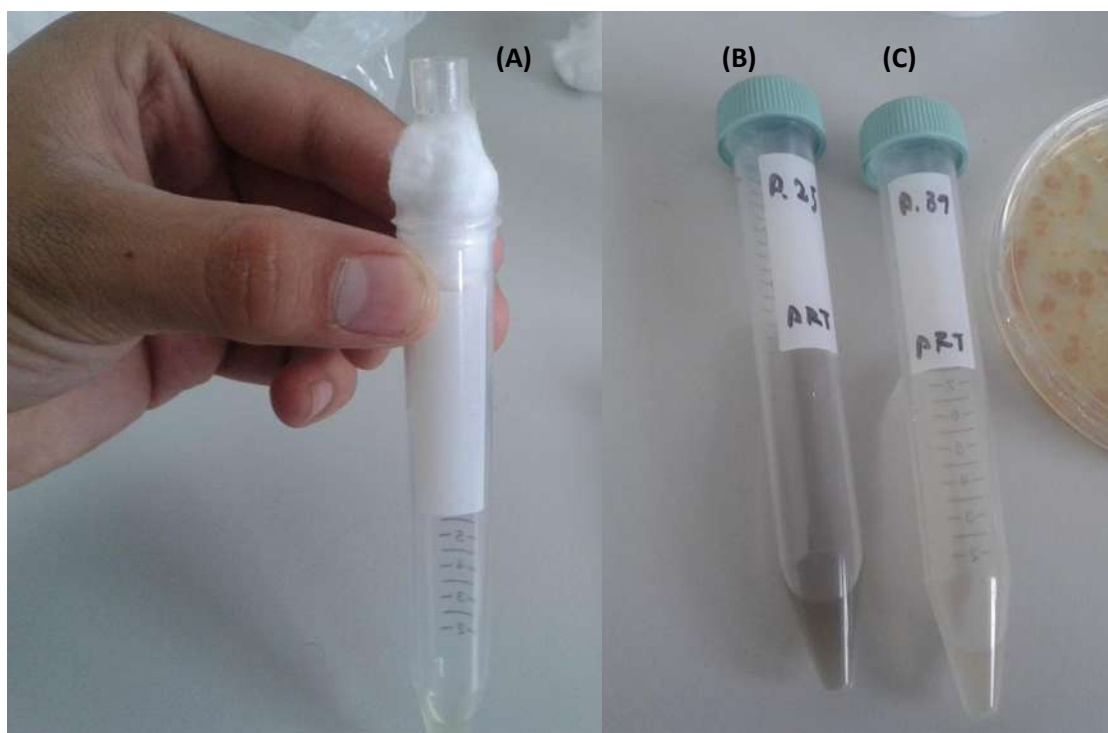


Figura 28. Dispositivo para filtrado de esporas de actinomicetos (A), el filtrado de esporas antes de lavado (B) y después de lavados con agua destilada (C).

Al fondo de los tubos se obtuvo una solución de esporas la cual se lavó tres veces, para ello cada tubo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se adicionaron a la pastilla de esporas 10 mL de agua destilada estéril, se agitó en vortex y nuevamente se centrifugó repitiendo este paso dos veces más. Al pellet o pastilla de esporas, se agregaron de 1 a 2 mL de glicerol al 25%, se mezcló y las cepas de actinomicetos se guardaron en microviales para crioconservación a una temperatura de -20°C . Después de 20 días las muestras se descongelaron y se extrajo una asada para transferirla a cajas Petri con PDA para comprobar el estado de las muestras crioconservadas.

2.6.6 Conservación de *Phytophthora capsici*

Las cepas de *Phytophthora capsici* se crecieron en agar-harina de maíz por cinco a siete días, pasado ese tiempo se cortaron discos con micelio de tres milímetros de diámetro los cuales fueron colocados en tubos Eppendorf con 1.5 mL de agua destilada estéril para almacenarse a 15°C . Con este método las

cepas de *Phytophthora capsici* pueden permanecer hasta un año, después de este tiempo es necesario volverlas a reactivar para conservarlas nuevamente.

2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar los resultados con la escala de inhibición del crecimiento se encontró que todas las combinaciones presentaron distinto grado de antagonismo (Figura 29). En el caso de la confrontación entre las cepas ABV39 y ABV47 se observó que, la cepa ABV39 inhibió por completo el crecimiento de la cepa ABV47, caso contrario a lo observado en la confrontación ABV65-ABV49 donde no se observó inhibición entre ambas cepas.

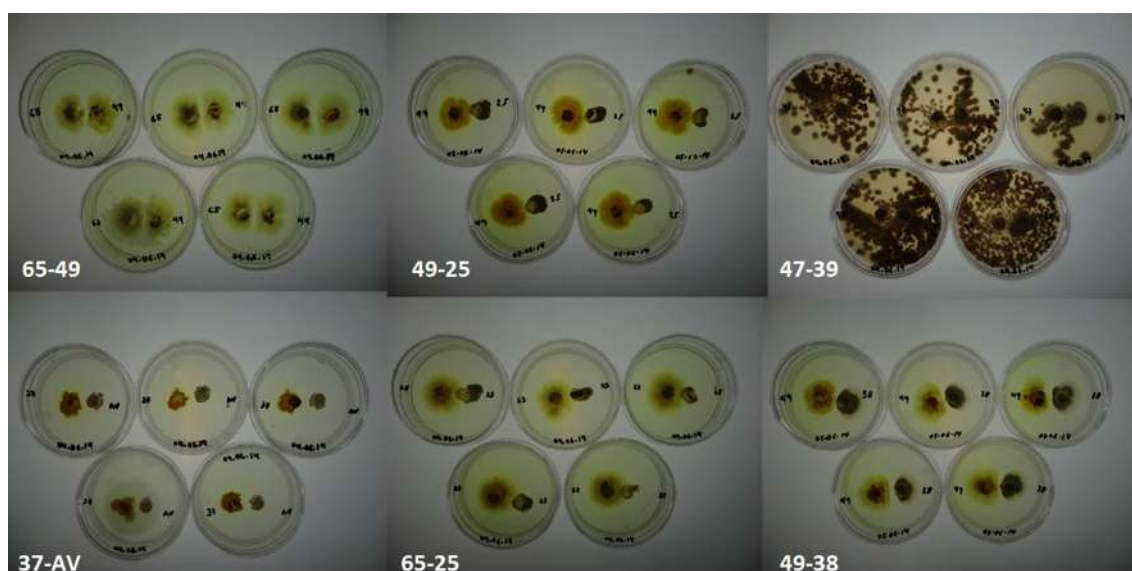


Figura 29. Inhibición entre cepas de actinomicetos en confrontación dual *in vitro*.

En el Cuadro 3, se presenta la inhibición del crecimiento entre las diferentes combinaciones de actinomicetos y la dirección de la inhibición (la cepa de actinomiceto que inhibe a la otra o ambas).

Cuadro 3. Inhibición de las 78 combinaciones de actinomicetos en base a la escala de inhibición del crecimiento.

Combinación	Escala					Inhibición
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	
65-48	0	0	0	0	0	-----
65-47	2	1	1	2	1	65 a 47
65-45	1	1	1	2	1	65 a 45
65-49	0	0	0	0	0	-----
65-46	1	1	3	1	1	65 a 46
65-02	2	2	2	2	-----	65 a 2
65-22	1	1	1	1	1	22 a 65
65-38	1	1	2	2	1	65 a 38
65-39	2	2	1	1	2	65 a 39
65-25	3	3	5	3	5	65 a 25
65-AV	2	1	1	2	1	Ambos
65-37	0	0	0	0	0	-----
48-47	3	2	2	3	3	48 a 47
48-37	1	1	1	1	1	Ambos
48-45	2	2	2	2	2	48 a 45
48-49	0	0	0	0	0	-----
48-46	1	2	2	3	1	48 a 46
48-02	3	2	2	3	2	48 a 2
48-22	2	1	1	1	0	48 a 22
48-38	2	2	2	2	2	48 a 38
48-39	1	2	1	1	2	48 a 39
48-25	2	3	3	3	2	48 a 25

48-AV	1	1	1	1	-----	Ambos
47-37	2	2	3	2	3	37 a 47
47-45	1	1	1	0	0	45 a 47
47-49	2	1	2	2	2	49 a 47
47-46	3	3	4	4	2	46 a 47
47-02	0	1	1	1	-----	2 a 47
47-22	1	1	1	1	0	22 a 47
47-38	1	0	1	1	1	47 a 38
47-39	5	5	5	5	5	39 a 47
47-25	1	1	1	2	1	47 a 25
47-AV	2	2	2	2	-----	AV a 47
37-45	3	3	1	2	2	37 a 45
37-49	0	0	0	0	0	-----
37-46	1	1	1	1	1	Ambos
37-02	2	2	2	2	2	37 a 2
37-22	1	1	0	1	1	37 a 22
37-38	3	3	1	2	2	37 a 38
37-39	2	2	2	2	2	37 a 39
37-25	3	4	3	3	3	37 a 25
37-AV	1	1	3	1	1	AV a 37
45-49	1	1	1	1	-----	49 a 45
45-46	2	2	4	3	2	46 a 45
45-02	1	1	1	1	1	2 a 45
45-22	0	0	0	1	-----	22 a 45
45-38	1	1	1	1	1	45 a 38
45-39	5	3	2	4	3	39 a 45

45-25	0	0	0	0	0	-----
45-AV	2	2	2	2	3	AV a 45
49-46	2	1	2	-----	-----	49 a 46
49-02	3	2	2	2	2	49 a 2
49-22	1	1	1	1	1	Ambos
49-38	2	2	1	2	1	49 a 38
49-39	1	2	3	3	2	Ambos
49-25	2	3	2	2	3	49 a 25
49-AV	0	2	3	2	1	AV a 49
46-02	1	0	0	1	0	46 a 2
46-22	1	1	1	1	0	22 a 46
46-38	3	2	2	1	2	46 a 38
46-39	0	0	0	0	0	-----
46-25	2	2	2	3	2	46 a 25
46-AV	1	1	1	1	1	AV a 46
02-22	0	0	0	0	0	-----
02-38	1	2	1	3	1	2 a 38
02-39	0	0	0	0	0	-----
02-25	1	1	1	1	1	2 a 25
02-AV	0	0	0	0	0	-----
22-38	1	1	1	1	1	22 a 38
22-39	4	2	3	3	3	39 a 22
22-25	1	1	1	1	-----	22 a 25
22-AV	0	0	0	0	-----	-----
38-39	4	3	4	4	5	39 a 38
38-25	1	1	1	1	1	38 a 25

38-AV	2	2	3	2	3	AV a 38
39-25	2	0	0	0	4	39 a 25
39-AV	4	2	2	2	2	AV a 39
25-AV	1	1	1	1	1	AV a 25

(----): no hubo inhibición entre cepas de actinomicetos, AV: Actinovate, Rep: repetición.

Se encontró que de las 78 combinaciones evaluadas, 11 no presentaron inhibición, estas combinaciones fueron: ABV: 65-48, 65-49, 65-37, 48-49, 37-49, 45-25, 02-22, 02-39, 02-AV, 46-39 y 22-AV. Todas las combinaciones anteriores resultaron estadísticamente iguales (barras en color verde en Figura 30). Como todas estas combinaciones no mostraron inhibición pueden ser aplicadas conjuntamente *in planta*. Las combinaciones ABV: 45-22, 46-02, 47-45, 47-02, 46-22, 47-22, 47-38 y 37-22 mostraron un nivel de inhibición cercano a uno; sin embargo, resultaron estadísticamente similares a las combinaciones de actinomicetos que no mostraron inhibición. Por lo que, éstas combinaciones también podrían ser usadas en formulaciones combinadas.

La combinación ABV47-39 es la menos recomendable ya que presentó una alta inhibición con un nivel de seis en la escala generada (Figura 27), siendo diferente estadísticamente al resto (Figura 30). La cepa ABV39 es capaz de crecer sobre la cepa ABV47 evitando que ésta crezca. Tampoco son recomendables las combinaciones ABV: 38-39 y 65-25 puesto que se inhiben entre sí.

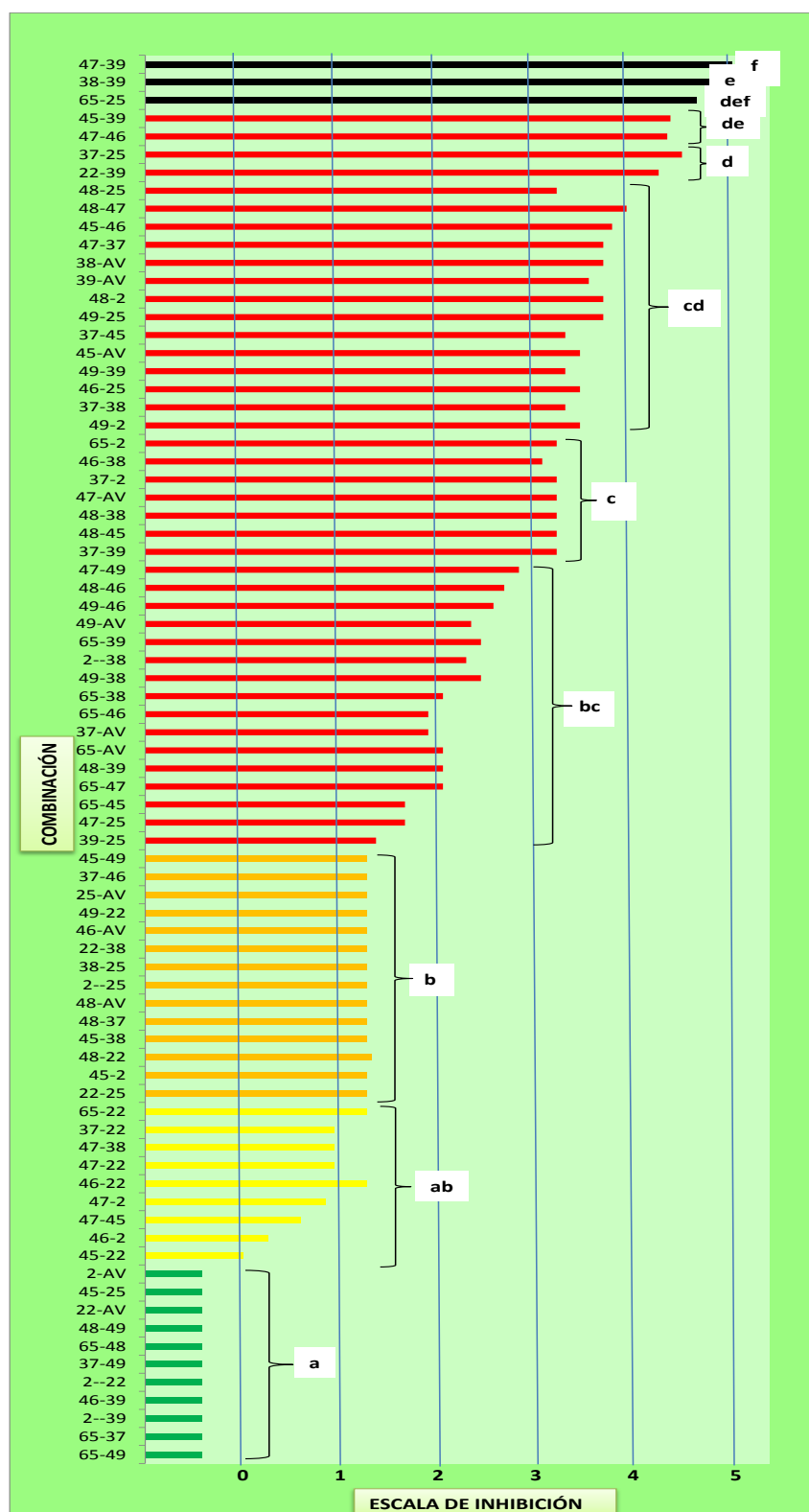


Figura 30. Nivel de inhibición del crecimiento entre combinaciones de actinomicetos con actividad antimicrobiana. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a Duun ($p < 0.05$).

Las cepas ABV39, 45 y 38 fueron las que mostraron una mayor inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici in vitro* en el experimento descrito en el capítulo 1. Por lo tanto, son las de mayor interés en la búsqueda de compatibilidad para una posible inoculación combinada. Los resultados de antagonismo entre las combinaciones de las cepas anteriores indicaron niveles (de acuerdo a la escala de inhibición) de 3 (ABV45-39), total (ABV38-39) y 1 (ABV45-38) (Cuadro 4). La combinación entre las cepas ABV45-39 no es recomendable debido a que existe un nivel 3 que indica una fuerte inhibición de la cepa ABV39 hacia la cepa ABV45. La combinación de las cepas ABV39-38 presentó una inhibición de 4 a 5 por lo que se inhiben totalmente, en este caso ABV39 inhibe a ABV38 y no es recomendable para realizar una formulación conjunta con estas dos cepas. La combinación ABV45 con ABV38, mostró un nivel de inhibición de 1 (se inhiben levemente entre ellas), es por ello que es más viable inocular esta combinación si se toma en cuenta estas tres cepas de actinomicetos. Sin embargo, de acuerdo con sus características macromorfológicas la capacidad para esporular de las cepas ABV45 y ABV38 es muy baja, lo cual complica la elaboración de la formulación y no sería recomendable pues es necesaria una abundante cantidad de esporas para la inoculación.

Cuadro 4. Inhibición del crecimiento *in vitro* de las combinaciones entre las cepas de actinomicetos más efectivas en cuanto a inhibición de *Phytophthora capsici*.

Combinación	Escala	Dirección de la inhibición de los actinomicetos
38-39	4-5	39 a 38
45-39	3	39 a 45
45-38	1	45 a 38

Las combinaciones que resultaron en un nivel de inhibición de cero fueron ABV: 65-48, 65-49, 65-37, 48-49, 37-49, 45-25, 02-22, 46-39, 02-39, 02-AV y 22-AV, por este motivo podrían ser recomendables para la elaboración de formulaciones combinadas. Son de particular interés las combinaciones en las

cuales este presente la cepa ABV39, debido a que fue la más efectiva en cuanto a inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici*. Es por ello que las combinaciones ABV46-39 y 02-39 resultarían ser una alternativa para su aplicación *in planta*, además de que estas cepas presentan una alta producción de esporas lo que facilita la inoculación.

Se reportan escasos estudios en la literatura donde se evalúe el antagonismo o compatibilidad entre cepas de actinomicetos con actividad antimicrobiana contra fitopatógenos. Sin embargo, en este trabajo se encontró que cepas con características macromorfológicas similares (color de la colonia o del metabolito secundario secretado en el medio) no presentaron inhibición entre ellas. En la Figura 29 se observa que la combinación ABV65-49 no mostró inhibición (0 de acuerdo a la escala), estas cepas presentaron una coloración amarilla por lo que podrían ser tolerantes a los antibióticos secretados entre ellas. Sin embargo, al colocarlas frente a cepas de color café (ABV49-25, ABV65-25) y blanco (ABV49-38), se presentaron diferentes niveles de inhibición del crecimiento (entre 2 y 5). De acuerdo a lo anterior, existe un mayor antagonismo entre morfo-cepas con características macromorfológicas distintas y/o no existe inhibición del crecimiento entre cepas macromorfológicamente similares. Sin embargo, para que esta aseveración se confirme, se requiere de la caracterización taxonómica, molecular, y bioquímica de las cepas de actinomicetos para determinar si se trata de especies del mismo género o variantes fenotípicas de una misma especie (Rahman *et al.*, 2008). En este sentido Mokni Tlili *et al.* (2013), reportaron que entre actinomicetos con una misma afiliación u origen filogenético no se presentan interacciones antagónicas. Sin embargo, Giudice *et al.* (2007) afirman que el antagonismo entre aislados bacterianos tales como los actinomicetos depende en gran medida de la cepa específica evaluada.

Por otro lado, no existen trabajos sobre compatibilidad entre cepas de actinomicetos y se reportan muy pocos en la literatura que mencionen éste tipo de evaluaciones entre dos o más microorganismos benéficos con capacidad para combatir agentes fitopatógenos. La mayoría de los trabajos tratan sobre la compatibilidad funcional entre HMA y hongos micoparásitos (De Jaeger *et al.*

(2011). Estos resultados refuerzan la necesidad de realizar ensayos de compatibilidad entre cepas de microorganismos antagónicos a fitopatógenos con el objetivo de potencializar su efecto y actuar en consorcio.

2.8 CONCLUSIONES

Las combinaciones ABV: 65-48, 65-49, 65-37, 48-49, 37-49, 46-39, 45-25, 02-22, 02-39, 02-AV y 22AV no presentaron inhibición, indicando su posible aplicación conjunta en el control de *Phytophthora capsici in planta*. Las combinaciones: ABV 47-39, 38-39 y 65-25 no son recomendables para el desarrollo de formulaciones puesto que presentaron un alto nivel de inhibición de 4 a 5. Las combinaciones ABV 46-39 y 02-39 son una alternativa para su aplicación conjunta *in planta* al ser cepas con una alta capacidad para esporular e incluir a la cepa ABV39 la cual es eficaz en la inhibición de *Phytophthora capsici*.

2.9 LITERATURA CITADA

- Cano, M. A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 14: 15-31.
- De Jaeger N., I. E. de la Providencia, H. Rouhier and S. Declerk. 2011. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp. within alginate beads: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. Journal of Applied Microbiology 111: 125-135.
- Franco-Correa M., A. Quintana, C. Duque, C. Suárez, M. X. Rodríguez and J. M. Barea. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Applied Soil Ecology 45: 209–217.
- Giudice A. L., M. Brilli, V. Bruni, M. D. Domenico, R. Fani and L. Michaud. 2007. Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawater (Terra Nova Bay, Ross Sea). FEMS Microbiology Ecology 60: 383-396.

- Medina-Cuevas, H. M. y Z. Evangelista-Martínez. 2011. Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. *Tecnociencia* 5: 72-78.
- Mokni-Tlili S., N. Jedidi and A. Hassen. 2013. Antagonistic interactions among cultivable actinomycetes isolated from agricultural soil amended with organic residues. *African Journal of Microbiological Research* 7: 3304-3320.
- Rahman O., S. P. Cummings and I. C. Sutcliffe. 2008. Phenotypic variation in *Streptomyces* sp. DSM 40537, a lipoproteic acid produced actinomycete. *Letters in Applied Microbiology* 40: 226-229.
- Sabaratnam S., and J. A. Traquair, 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control* 23: 245–253.

CAPÍTULO 3

SELECCIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL Y BIOPROTECCIÓN CONTRA *Phytophthora capsici* L. EN CHILE

3.1 RESUMEN

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es de gran importancia económica, biológica y cultural en México; sin embargo, uno de los principales problemas en la producción es la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* L. El desarrollo de alternativas de control sustentables mediante la aplicación de microorganismos antagonistas como hongos micorrízicos arbusculares (HMA) resulta ser una alternativa prometedora al control químico. Con el objetivo de evaluar la promoción del crecimiento y bioprotección de consorcios de hongos micorrízicos arbusculares contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile serrano y poblano, se realizó un experimento bajo condiciones de invernadero. Se evaluaron siete inóculos de HMA, un testigo positivo (*Rhizophagus intraradices*) y un testigo negativo (sin HMA). A 56 días de la inoculación de los HMA, se evaluaron las variables de crecimiento de altura de planta (AP), diámetro del tallo (DT), número de hojas (NH), además del porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas de HMA en la mezcla de suelo. A 75 días después del trasplante las plantas de chile se inocularon con una suspensión de zoosporas de *Phytophthora capsici*. Veinte días después de la inoculación se evaluó el nivel de daño de las plantas mediante una escala cualitativa ordinal de severidad de seis niveles y se registró la biomasa fresca aérea y radical. Los resultados mostraron elevados porcentajes de colonización micorrízica hasta un 93.3%. En plantas de chile serrano el consorcio micorrízico Cerro del Metate (CM) registró los mayores valores de AP, DT y NH, en chile poblano no se encontraron diferencias estadísticas en las variables de crecimiento a excepción de AP. Las plantas inoculadas con el consorcio micorrízico CM en ambas variedades de chile, presentaron un grado de severidad de (uno) así como mayor biomasa fresca aérea (15.4 en serrano y 7.95 g en poblano). Los resultados mostraron que el consorcio CM promovió el

crecimiento y tuvo un efecto bioprotector contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile serrano y poblano.

3.2 ABSTRACT

The chili crop (*Capsicum annuum* L.) is of great economic, biological and cultural importance in Mexico; however, one of the main problems in production is wilting caused by *Phytophthora capsici* L. The development of alternatives of control sustainable by application of antagonistic microorganisms as arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) appears to be a promising alternative to chemical control. With the aim of evaluate the growth promotion and bioprotection by arbuscular mycorrhizal fungi consortia in chili plants of serrano and poblano against *Phytophthora capsici*, an experiment under greenhouse conditions was performed. Seven inocula of AMF were evaluated; a positive control (*Rhizophagus intraradices*) and a negative control (without AMF) were evaluated. At 56 days after inoculation of AMF, growth variables as height plant (HP), stem diameter (SD), number of leaves (NL), and mycorrhizal colonization percentage f and AMF spores in the soil mixture were evaluated. At 75 days after transplant, the chili plants were inoculated with *Phytophthora capsici* zoospores suspension. Twenty days after inoculation, the plant severity level was assessed using a severity ordinal qualitative scale of six levels, and fresh root biomass was recorded. The results showed high mycorrhizal colonization percentages, up to 93.3%. In serrano chili plants, the mycorrhizal consortium Cerro of Metate (CM) recorded the highest values of PH, SD and NL, in poblano chili there were not statistical differences in the growth variables, except to HP. The plants inoculated with CM mycorrhizal consortium in both chili varieties, showed a degree of severity of one and greater biomass fresh (15.4 in serrano and 7.95 g in poblano). The results showed that CM consortium promoted the plant growth and had a bioprotector effect against *Phytophthora capsici* on serrano and poblano chili plants.

3.3 INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), propician una mejor nutrición a las plantas debido a la simbiosis que establecen con ellas. Al colonizar las raíces los HMA sirven como un extensión que permite a la planta

una mayor superficie de exploración para la asimilación de nutrientes minerales y agua (Smith y Read, 2008). La mejora nutricional permite tener una mayor resistencia/tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Además de éste beneficio, es de particular interés el papel que desempeñan los HMA en el control biológico de enfermedades. Estos hongos son capaces de competir con microorganismos fitopatógenos por espacio y nutrientes en la rizósfera, también se ha demostrado que una vez que se establece el HMA éste evita la penetración posterior de fitopatógenos en la raíz al ocupar los sitios de infección (Trotta *et al.*, 1996). Por otro lado, al momento de establecerse la simbiosis ocurre un cambio en la fisiología de la planta modificando los patrones de exudación de las raíces propiciando el establecimiento de microorganismos benéficos (Lioussanne, 2010). Los HMA también son capaces de inducir resistencia sistémica (RSI) en las plantas al encender su sistema de alerta al momento de colonizar la raíz y activar fitohormonas como el ácido jasmónico y el etileno que conllevan a la síntesis de sustancias tóxicas para el fitopatógeno conocidas como fitoalexinas (Ozgonen y Erkilic, 2007) y proteínas relacionadas con la patogénesis (Madriz-Ordeñana, 2002). Aunado a la RSI, la simbiosis micorrízica estimula una respuesta muy sensitiva en la planta ante la presencia de un agente fitopatógeno evitando su establecimiento, este mecanismo es conocido como “priming” (Haneef-Khan *et al.*, 2010).

En este capítulo se desarrolló una selección de consorcios micorrízicos en la promoción del crecimiento y bioprotección de plantas de chile serrano y poblano contra *Phytophthora capsici*.

3.4 HIPÓTESIS

Diferentes inóculos de Hongos Micorrízicos Arbusculares incrementan el crecimiento y biomasa en plantas de chile serrano y poblano, e inducen un efecto bioprotector frente a *Phytophthora capsici*.

3.5 OBJETIVO

- Determinar el efecto benéfico por parte de diferentes inóculos de HMA en la promoción del crecimiento de plantas de chile serrano y poblano.

- Evaluar el efecto bioprotector de diferentes inóculos de HMA en la disminución de la severidad de la marchitez en plantas de chile serrano y poblano.

3.6 METODOLOGÍA

3.6.1 Reactivación de la capacidad infectiva de *Phytophthora capsici*

El manejo por tiempo prolongado en cultivos *in vitro* de oomycetes y hongos fitopatógenos puede ocasionar la pérdida de su capacidad infectiva, es por ello que es necesario realizar una infección *in planta* y reaislar nuevamente el fitopatógeno a partir de tejido dañado para reactivar su capacidad infectiva y ser posteriormente utilizado en experimentos que impliquen su evaluación *in planta* (Torres *et al.*, 2008).

Se utilizaron plantas de chile serrano variedad tampiqueña de 40 días de edad (con cuatro hojas verdaderas) para realizar la infección de *Phytophthora capsici*. Se realizó la inoculación de tres cepas del fitopatógeno: CH11, PC88 y PC89, mediante la colocación de discos de PDA con micelio directamente en la base del tallo y raíces superficiales de las plantas de chile (Figura 31). Se utilizaron tres repeticiones por cepa y un testigo sin inocular por duplicado.



Figura 31. Colocación de discos con micelio de *Phytophthora capsici* en plantas de chile serrano para la inoculación y reactivación de la capacidad infectiva.

El reaislamiento de las cepas de *Phytophthora capsici* se realizó después de observar síntomas típicos de marchitez tales como marchitamiento y enrollamiento de hojas, colapso y necrosis del tallo (Figura 32). Se extrajeron las plantas infectadas y se colectó tejido enfermo. La metodología consistió en colocar trozos de 0.5 x 0.5 cm de tallo y raíz infectada con presencia de tejido sano en cajas Petri con agua y cloro al 10% para lavar y enjuagar, posteriormente se secaron con papel filtro estéril y se colocaron nueve trozos en cajas Petri con PDA (Figura 33).



Figura 32. Planta de chile serrano con síntomas de marchitez provocada por *Phytophthora capsici*.



Figura 33. Trozos de tejido enfermo por marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en PDA.

Después de 48 horas de haber colocado el tejido infectado en PDA, se observó el crecimiento de *Phytophthora capsici*. Para purificar las cepas se procedió a extraer discos con micelio y se transfirieron a cajas Petri con PDA a pH ± 4 adicionado con ácido tartárico al 10% para evitar el crecimiento de bacterias contaminantes. Después de observar el crecimiento (sin contaminantes), las cepas fueron transferidas nuevamente a PDA para así obtener cultivos puros con la capacidad infectiva reactivada, listas para su re-inoculación *in planta*.

3.6.2 Tratamientos evaluados

Se realizaron dos experimentos uno con chile serrano y otro con chile poblano. Se evaluó el factor HMA con nueve niveles correspondientes a siete consorcios micorrízicos: El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El limón (EL), Cerro del Metate (CM) y Barranca de las Nueces (BN); un control positivo que fue un producto comercial elaborado a base de *Rhizophagus intraradices* y un control sin inóculo (S/HMA). Cada tratamiento con cuatro repeticiones generó un total de 36 unidades experimentales distribuidas en bloques completos al azar para cada variedad de chile (Cuadros 5 y 6).

Cada unidad experimental consistió en una maceta con una planta de chile y el inóculo de HMA correspondiente. El experimento en chile serrano se estableció siete días antes que el de chile poblano debido a que el tiempo de germinación se retardó en esta última variedad.

Cuadro 5. Diseño experimental para la selección de HMA en chile serrano.

Bloque 2	Bloque 4	Bloque 1	Bloque 3
S/HMA	BN	PA	CM
BN	CM	EH	S/HMA
<i>R. intraradices</i>	RCR	EL	RCR
CM	LC	LC	<i>R. intraradices</i>
LC	S/HMA	S/HMA	LC
PA	EH	BN	EH
EH	EL	RCR	PA
EL	PA	<i>R. intraradices</i>	BN
RCR	<i>R. intraradices</i>	CM	EL

El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN) Sin HMA (S/HMA).

Cuadro 6. Diseño experimental para la selección de HMA en chile poblano.

Bloque 1	Bloque 3	Bloque 2	Bloque 4
EH	EL	EL	<i>R. intraradices</i>
S/HMA	EH	LC	BN
BN	PA	CM	EL
CM	BN	<i>R. intraradices</i>	S/HMA
RCR	S/HMA	S/HMA	CM
LC	<i>R. intraradices</i>	EH	EH
EL	RCR	RCR	RCR

<i>R. intraradices</i>	LC	PA	LC
PA	CM	BN	PA

El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN) Sin HMA (S/HMA).

3.6.3 Inoculación de *Phytophthora capsici*

Posteriormente a los 72 días después del trasplante, todas las plantas de ambas variedades de chile fueron inoculadas con 1 mL de una suspensión de zoosporas de *Phytophthora capsici* ajustada a una concentración de 1×10^4 mL⁻¹ para determinar el grado de bioprotección de los inóculos de HMA en base a una escala visual de virulencia.

3.6.4 Establecimiento de los experimentos

a) Siembra y germinación de semillas.

Las semillas de chile poblano (cultivar San Luis) y serrano (cultivar Tampiqueña) se sembraron en charolas de aluminio con arena estéril. Se desarrolló un registro cronológico del crecimiento y desarrollo de ambas variedades de chile, desde la siembra, germinación y emergencia del hipocotilo, presencia de hojas embrionarias y hojas verdaderas. Las plantas se trasplantaron cuando presentaron cuatro hojas verdaderas a los 35 días después de la siembra en chile serrano y a los 40 días de la siembra en chile poblano.

b) Sustrato.

El sustrato utilizado consistió de una mezcla de suelo-arena en proporción 1:1 (v/v), ésta mezcla se esterilizó en autoclave a 120°C durante tres horas por tres veces. Los recipientes de las macetas consistieron en vasos de unicel de un volumen de 500 mL de capacidad (Figura 34).



Figura 34. Macetas con sustrato estéril para el establecimiento de los experimentos con plantas de chile.

c) Inoculación de HMA.

Los siete consorcios micorrízicos evaluados: EH, LC, RCR, PA, EL, CM y BN, provienen de suelos agaveros del estado de Michoacán, *Rhizophagus intraradices* es un inóculo comercializado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Los diferentes inóculos de HMA se obtuvieron a partir de macetas trampa para propagación de esporas de seis meses de edad. Se realizó una cuantificación del contenido total de esporas en 100 g de sustrato seco con tres repeticiones. Al final se ajustó el peso en gramos de sustrato para que tuvieran 80 esporas de HMA por cada inóculo (Figura 35), incluyendo el control positivo.



Figura 35. Inóculos de HMA aplicados durante el establecimiento de los experimentos. Cada inóculo constó de 80 esporas.

La inoculación de los HMA en chile serrano (Figura 36) y chile poblano (Figura 37) se realizó al momento del trasplante, cubriendo completamente el sistema radical de la planta con el inóculo correspondiente.



Figura 36. Inoculación de HMA al momento del trasplante: a) chile serrano, b) chile poblano.

d) Preparación de suspensión de zoosporas de *Phytophthora capsici*.

Para determinar el efecto bioprotector de los diferentes tratamientos, todas las unidades experimentales fueron inoculadas con una suspensión de zoosporas de *Phytophthora capsici* obtenidas de la cepa CH11. Esta suspensión fue preparada mediante la técnica de Ristaino con modificaciones (1990).

Se seleccionó la cepa CH11 debido a que ésta fue la más virulenta y manifestó una mayor velocidad de infección y aparición de los síntomas de la enfermedad al momento de realizar la reactivación de la patogenicidad en plantas de chile serrano. Para la producción de esporangios, la cepa CH11 se cultivó en agar V8 a 27°C por cinco días, se cortaron discos con micelio de un centímetro y fueron transferidos a cajas de Petri esterilizadas, se adicionó agua estéril y se incubaron a 27°C; durante cinco-siete días. Se realizaron lavados con agua destilada estéril para inducir la formación de esporangios. La liberación de zoosporas se inició al colocar las cajas en el refrigerador a una temperatura de 4°C durante 30 a 60 min. Al momento de observar zoosporas éstas se cuantificaron en cámara de Neubauer, posteriormente se preparó una suspensión ajustando el número de zoosporas a una concentración de 1×10^4 mL⁻¹. Se inoculó la suspensión de 1mL en la base del tallo de las plantas de chile de ambas variedades.

3.6.5 Variables respuesta.

Se midieron cada 14 días desde el trasplante y durante ocho semanas las siguientes variables de crecimiento:

a) Altura de planta.

Se midió con un vernier digital desde la base del tallo hasta la base de las hojas más jóvenes.

b) Diámetro del tallo.

Se midió a la base del tallo con un vernier digital, aproximadamente a dos mm del sustrato.

c) Número de hojas.

Se contaron a partir de las hojas verdaderas desde la base hasta las más jóvenes que presentaban una longitud mayor a un centímetro.

A los 60 días después del trasplante, con ayuda de un sacabocados de 1.5 cm de diámetro se obtuvieron muestras de suelo y raíces directamente de cada una de las unidades experimentales, posteriormente se midieron las siguientes variables microbiológicas:

d) Colonización micorrízica.

Se desarrolló el método de clareo y tinción de raíces de Phillips y Hayman (1970). Posteriormente se colocaron 30 segmentos de 1 cm de raíz teñida en un portaobjetos para la observación de estructuras características de los HMA: micelio intrarradical, vesículas, arbusculos y esporas, (lo anterior se realizó por triplicado). La determinación del porcentaje de colonización micorrízica se realizó por el método descrito por McGonigle *et al.* (1990) mediante la siguiente fórmula:

$$\% CM = \frac{\text{Número de segmentos micorrizados}}{\text{Número total de segmentos}} (100)$$

Dónde: %CM = porcentaje de colonización micorrízica

e) Número de esporas de HMA.

Para la extracción de esporas se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación de Gerdemann y Nicholson (1963) en combinación con la técnica de flotación en azúcar en gradiente de sacarosa descrita por Walker (1997). El conteo de esporas se realizó en un microscopio estereoscópico con ayuda de un contador manual, se contabilizó el número total de esporas presentes en 100 g de suelo seco mediante la siguiente fórmula:

$$NE = \frac{\text{Número de esporas contabilizadas}}{\text{g de suelo seco}} (100)$$

Dónde: NE = número de esporas de HMA

f) Prueba de bioprotección.

Setenta y cinco días después del trasplante se inoculó la suspensión de zoosporas de *Phytophthora capsici*. Se midió el nivel de protección de las plantas de chile serrano y poblano mediante la observación de la sintomatología y comparación con una escala de virulencia descrita por Quinto-Álvarez (2014), la cual contempla valores de cero a seis (Cuadro 7). A los 21 días posteriores a la inoculación de *Phytophthora capsici* se realizó un muestreo destructivo para evaluar el nivel de daño de las plantas en ambas variedades de chile. Además se registró la biomasa fresca de la parte aérea y radical.

Cuadro 7. Escala de virulencia descrita por Quinto-Álvarez (2014).

Índice de severidad	Sintomatología
0	Planta sana
1	Planta con hojas parcialmente colapsadas, tallo erguido.
2	Planta con hojas colapsadas y con algunas desprendidas, tallo ligeramente inclinado.
3	Planta con hojas colapsadas y cloróticas, con algunas desprendidas, tallo ligeramente inclinado.
4	Plantas con hojas colapsadas, con algunas desprendidas, tallos desplomados, necrosis en la base del tallo.
5	Plantas con hojas totalmente colapsadas, con algunas desprendidas, tallos desplomados y con presencia de necrosis desde la base hasta la parte media del tallo.
6	Plantas con hojas totalmente colapsadas, con algunas desprendidas, tallos desplomados y con presencia de necrosis en más de 50% del tallo.

3.6.6 Análisis estadísticos

Para el análisis de las variables de crecimiento y las variables microbiológicas se realizó un análisis de varianza con una significancia del

0.05, así como la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza. En el caso de la biomasa fresca los datos se transformaron con exponencial para cumplir con la normalidad y homocedasticidad de varianza utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II.

En nivel de severidad de la enfermedad al ser comparado con la escala de virulencia se sometió a un análisis de varianza no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. Para determinar las diferencias estadísticas entre las medianas de los tratamientos se desarrolló una gráfica de caja y bigotes aplicando la prueba de Dunn, en el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II.

3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.7.1 Reactivación de la patogenicidad

Después de tres semanas de inocular las tres cepas de *Phytophthora capsici* en las plantas de chile se observaron los primeros síntomas de marchitez como son el marchitamiento y desprendimiento de hojas, colapso y necrosis del tallo (Figura 37).



Figura 37. Síntomas de marchitez en plantas de chile serrano infectadas para la reactivación de la capacidad infectiva de *Phytophthora capsici*.

Las plantas con síntomas de marchitez observadas correspondían a las infectadas con las cepas CH11 y PC88. La cepa CH11 mostró síntomas en las plantas infectadas a 20 días después de la inoculación mientras que en PC88 fue a los 24 días, por lo que la cepa CH11 podría considerarse más agresiva al infectar y manifestar síntomas de la enfermedad en las plantas de chile en menor tiempo. La cepa PC89 no logró infectar las plantas de chile serrano y la reactivación no fue posible llevarla a cabo, es posible que este resultado se deba a una menor capacidad infectiva de ésta cepa.

El reaislamiento de *Phytophthora capsici* se llevó a cabo en cultivo PDA donde las cepas CH11 y PC88 lograron crecer después de 48 horas de haber colocado las muestras de tejido radical infectado (Figura 38). Las cepas fueron transferidas a PDA + ácido tartárico para purificarla. A partir de estos cultivos puros se preparó la suspensión de zoosporas de la cepa CH11.

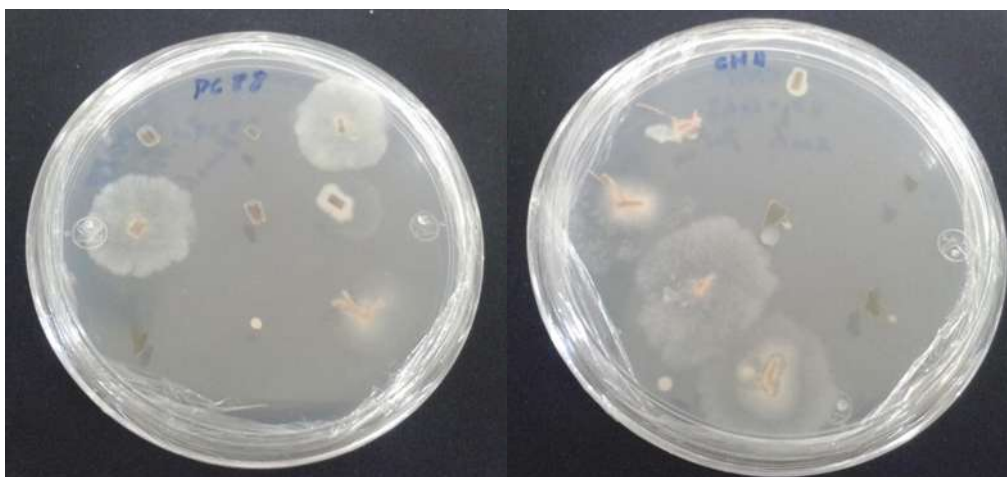


Figura 38. Crecimiento de las cepas PC88 y CH11 de *Phytophthora capsici* en PDA para aislamiento y purificación a partir de tejido vegetal enfermo.

3.7.2 Efecto de los HMA sobre variables de crecimiento en chile serrano y poblano

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) para todas las variables de crecimiento en chile serrano. En la Figura 39 se muestran los resultados de la altura de las plantas en chile serrano a los 56 días del trasplante ($p = 0.0206$), el tratamiento con el inóculo del consorcio micorrízico CM presentó el valor más alto con una media de 23 cm siendo estadísticamente diferente al control sin HMA que registró la media más baja (12.42 cm). Los inóculos BN, PA, LC y el control positivo fueron estadísticamente similares, mientras que EH y PA fueron iguales al tratamiento S/HMA.

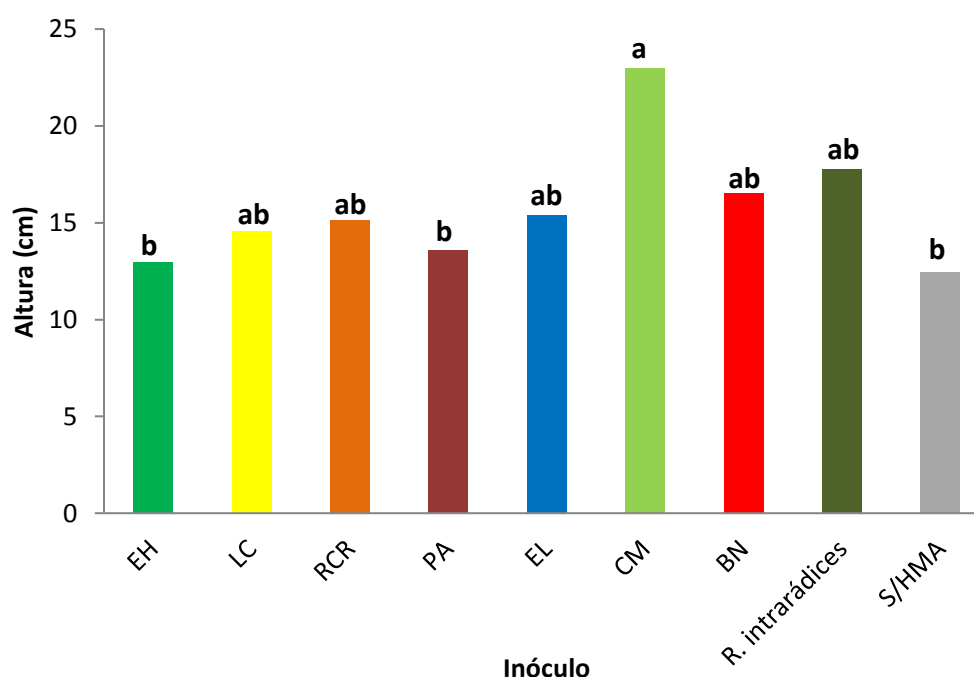


Figura 39. Efecto de la micorrización en la altura de plantas de chile serrano a los 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

Al evaluar el diámetro en la base del tallo en chile serrano (Figura 40), el análisis mostró diferencias estadísticas significativas ($p = 0.012$) donde el tratamiento CM fue estadísticamente superior con un promedio de 4.05 mm. Los inóculos LC y BN registraron resultados similares con 2.84 y 2.87 mm respectivamente, mientras que el resto de tratamientos tuvieron un efecto similar al tratamiento sin HMA. Se sabe que el diámetro del tallo es un parámetro que permite determinar el vigor de la planta (Rivera-Espinoza *et al.*, 2011), en éste aspecto el consorcio CM promueve un mayor vigor de las plantas de chile serrano lo que se ve reflejado en un mayor crecimiento.

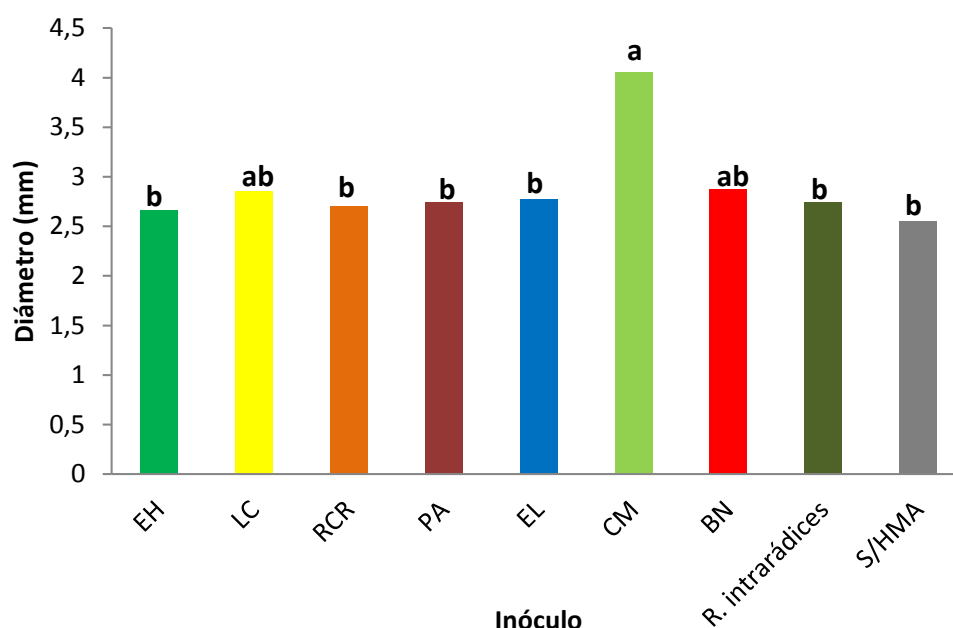


Figura 40. Efecto de la micorrización en el diámetro a la base del tallo en plantas de chile serrano a 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente distintos según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

En el número de hojas en chile serrano (Figura 41) el análisis mostró diferencias estadísticas ($p = 0.0003$), se observó de forma clara que el tratamiento CM fue superior al resto de tratamientos, puesto que presentó una media de 33.5 hojas en comparación con las 15.75 que se registró en el control negativo sin HMA. Los resultados obtenidos en las variables de crecimiento demuestran que el consorcio CM promovió un mayor crecimiento en las plantas de chile serrano a los 56 días después del trasplante.

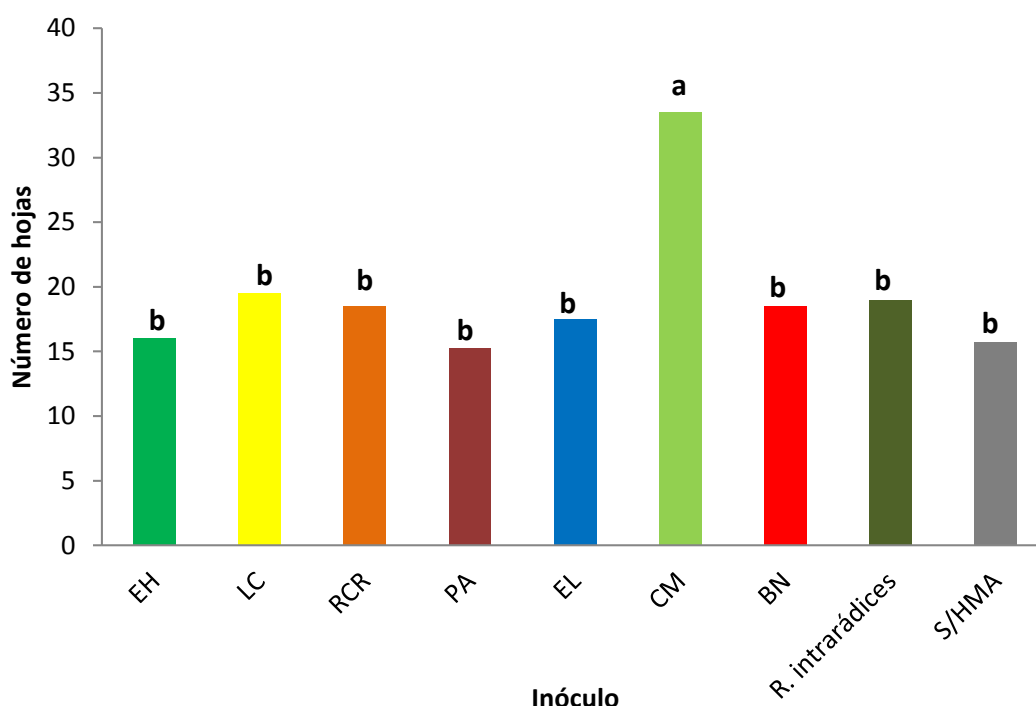


Figura 41. Efecto de la micorrización sobre el número de hojas en plantas de chile serrano a 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

En los resultados de las variables de crecimiento encontrados en chile poblano, no existieron diferencias estadísticamente significativas para la variable diámetro del tallo ($p = 0.71$) y número de hojas ($p = 0.63$), solamente se encontraron diferencias significativas para altura de planta ($p < 0.05$) en donde el inóculo LC fue estadísticamente superior al resto con una media de 18.09 cm (Figura 42).

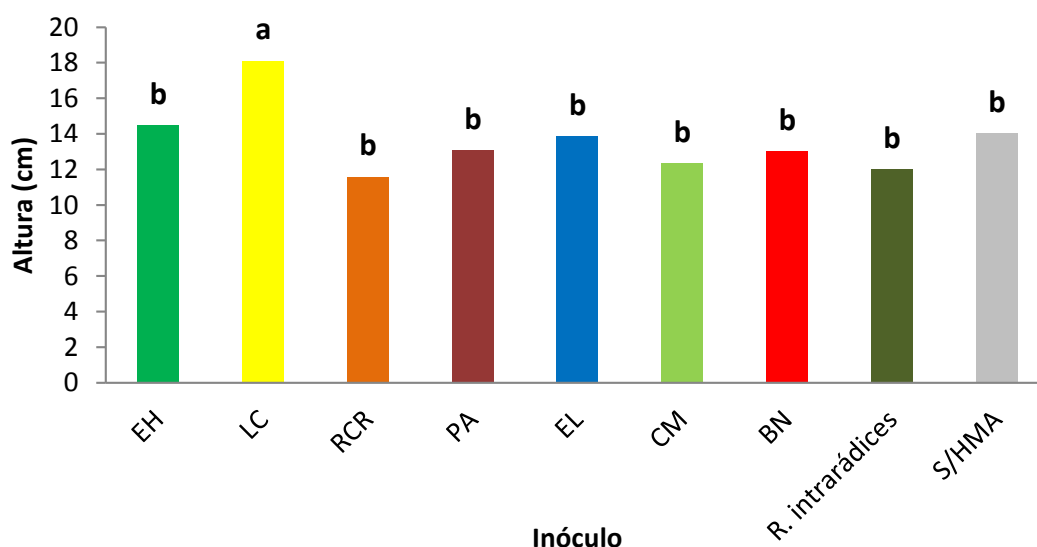


Figura 42. Efecto de la micorrización en la altura de plantas de chile poblano a 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

Con respecto a los resultados mostrados en todas las variables de crecimiento en ambas variedades se encontró que el consorcio CM fue el tratamiento que mejor promovió el crecimiento en altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas (Figuras 43 y 44).



Figura 43. Crecimiento de las plantas de chile serrano a 56 días después de inoculación con los HMA. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA), *Rhizophagus intraradices*

(INIFAP). La escala al fondo de la imagen representa 20 cm, cada cuadro representa 1 cm.



Figura 44. Crecimiento de las plantas de chile poblano a 56 días después de inoculación con los HMA. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA), *Rhizophagus intraradices* (INIFAP). La escala al fondo de la imagen representa 20 cm, cada cuadro representa 1 cm.

De manera general los resultados de las variables de crecimiento obtenidos en ambas variedades de chile son similares a los reportados por Alonso-Contreras *et al.* (2013), donde distintos consorcios micorrízicos aislados de la rizósfera de *Malus domestica* B. (manzano) tuvieron un efecto positivo al promover mayor diámetro del tallo y área foliar en plantas de *Capsicum annuum* L. Sin embargo no encontraron diferencias para altura de planta y número de hojas. Díaz-Franco *et al.* (2013), en un experimento en pimiento bajo condiciones de invernadero encontraron que la micorrización con *Rhizophagus intraradices* promovió el crecimiento y nutrición al incrementar el índice de clorofila, contenido foliar de N, P, Fe y Zn, e incrementaron el peso de frutos en un 30% respecto a plantas no micorrizadas. Los resultados reportados en la literatura y en el presente trabajo evidencian el efecto benéfico de los HMA como promotores del crecimiento vegetal en especies hortícolas como el chile. Por otro lado, en otras plantas de interés comercial se ha demostrado el efecto de los HMA en la promoción del crecimiento vegetal, en un estudio que evaluó inóculos micorrízicos en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum* M.) reportaron incrementos significativos en altura y biomasa seca (Fernández *et al.*, 2006). También la micorrización con HMA es

capaz de promover el crecimiento en plantas de interés medicinal como *Catharanthus roseus* donde la inoculación con HMA nativos incrementó el número de hojas y área foliar (Rosa-Mera *et al.*, 2012). Lo anterior refleja que los HMA son un recurso microbiológico de importancia en la biofertilización de plantas de interés económico, que inclusive podrían ser una alternativa a otros tipos de fertilización como la fertilización química (Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010).

3.7.3 Variables microbiológicas

En las variables microbiológicas se encontraron diferencias estadísticas para colonización micorrízica ($p = 0.00$) y densidad de esporas ($p = 0.00$) en ambas variedades de chile a los 56 días después de la inoculación. No se observó colonización micorrízica en el control negativo. En plantas inoculadas con HMA se observaron estructuras típicas de micorriza arbuscular como micelio intrarradical, vesículas y esporas (Figura 45).

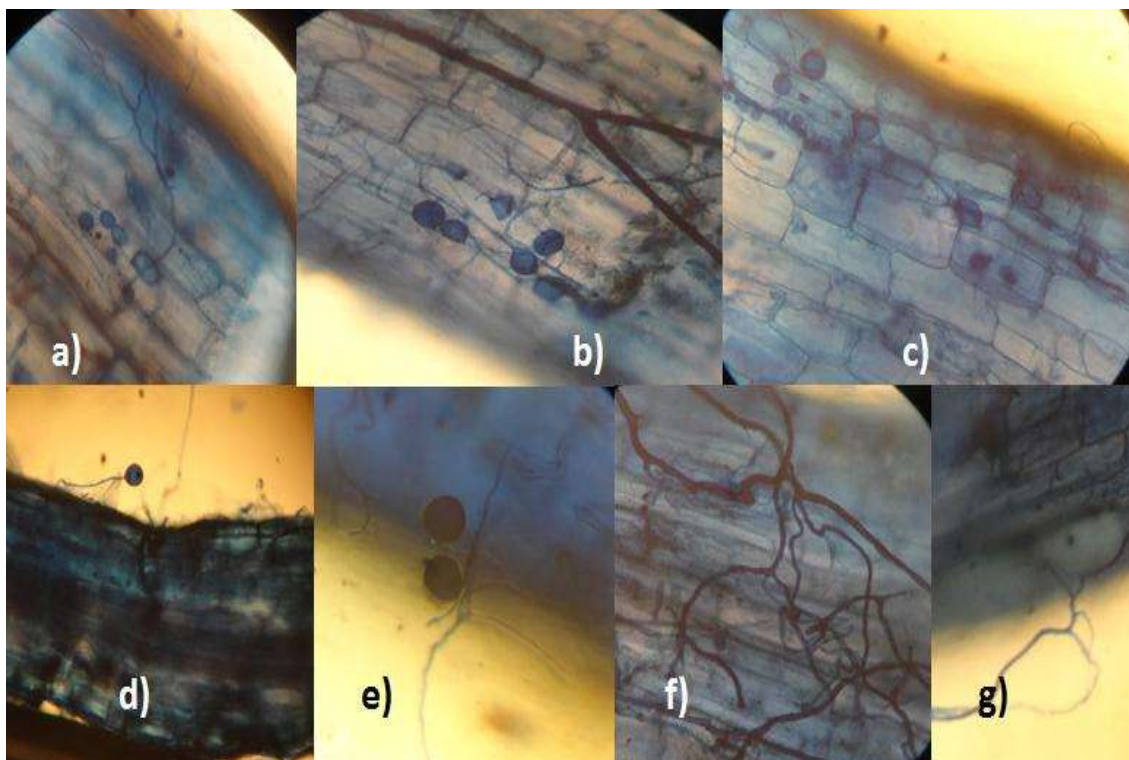


Figura 45. Estructuras que reflejan la colonización micorrízica en plantas de chile serrano y poblano: a), b), c) vesículas; d) y e) esporas; f) y g) micelio.

Los inóculos que registraron mayor micorrización de las raíces en chile serrano fueron BN y PA con 84.93% y 83.43%, *Rhizophagus intraradices* mostró el porcentaje de colonización más bajo con 33.6%, el resto de inóculos fueron estadísticamente similares, el inóculo CM que promovió mayor crecimiento en chile serrano sólo registró un 44.96% de colonización micorrízica (Figura 46), por lo tanto no es un inóculo infectivo pero sí efectivo en la promoción de crecimiento vegetal. Los conceptos infectividad (capacidad para colonizar la raíz) y efectividad (capacidad para promover el crecimiento vegetal) no están relacionados y se sabe que existen inóculos de HMA que colonizan la raíz en menor porcentaje (15-40%) y tienen un excelente efecto en la nutrición y crecimiento vegetal (Tapia-Goné *et al.*, 2010). Altos porcentajes de colonización micorrízica (93.3%) se encontraron en el inóculo LC en chile poblano, en este caso LC fue capaz de promover una mayor altura de planta y registrar una mayor micorrización por lo que se trata de un inóculo infectivo y efectivo para esa variable. Sin embargo, fue estadísticamente similar al resto de tratamientos en DT y NH.

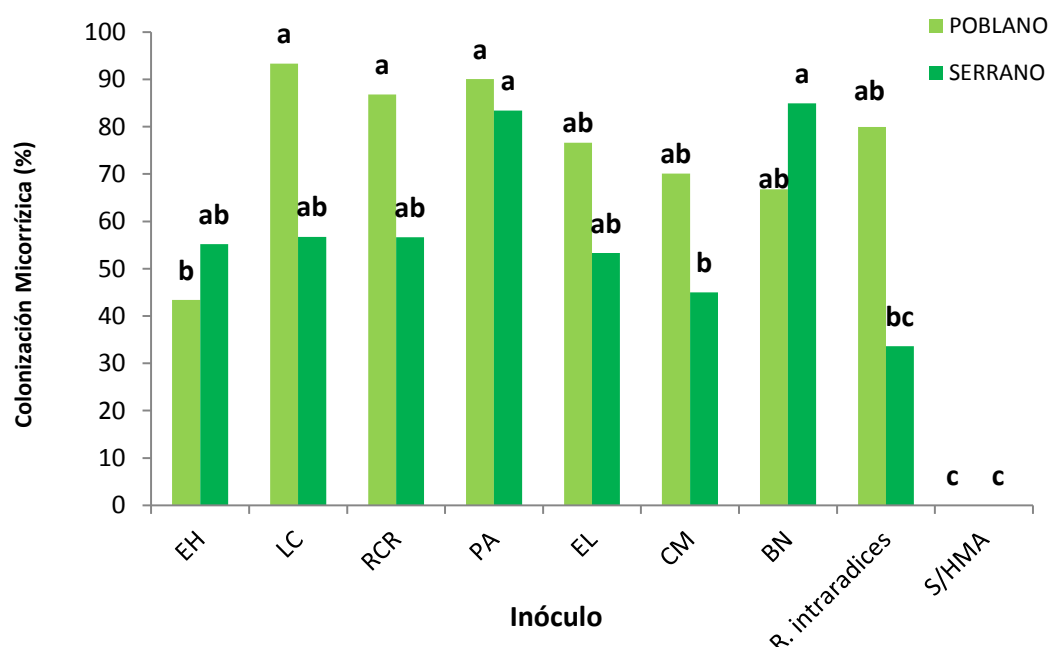


Figura 46. Colonización micorrízica en chile serrano y poblano a los 56 días después del trasplante. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las

Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

Respecto a la densidad de esporas (Figura 47), no se observaron en los controles negativos, en chile serrano los tratamientos donde se inocularon HMA registraron valores estadísticamente similares. En chile poblano el control con *Rhizophagus intraradices* mostró la menor cantidad de esporas con 130 en 100 g de suelo seco, la mayor densidad de esporas se registró en el inóculo EH con 406.4 que fue estadísticamente igual a LC, EL y similar al resto de tratamientos. Se encontró una correlación positiva (Pearson) entre colonización micorrízica y el número de esporas en chile poblano ($r = 0.5469$), también para chile serrano ($r = 0.7475$), esto concuerda con lo reportado en la mayor parte de la literatura, donde se ha encontrado que mayor densidad de esporas propicia una mayor colonización micorrízica (Vázquez *et al.*, 2010). Sin embargo, ambas variables no siempre son necesariamente dependientes y están en función de la especie o variedad vegetal y las especies de HMA utilizadas (Mendoza *et al.*, 2002). La densidad de esporas es una variable que indica la abundancia de propágulos de HMA que podría competir contra fitopatógenos por espacio y nutrientes otorgando bioprotección para la planta (Azcón-Aguilar y Barea, 1996).

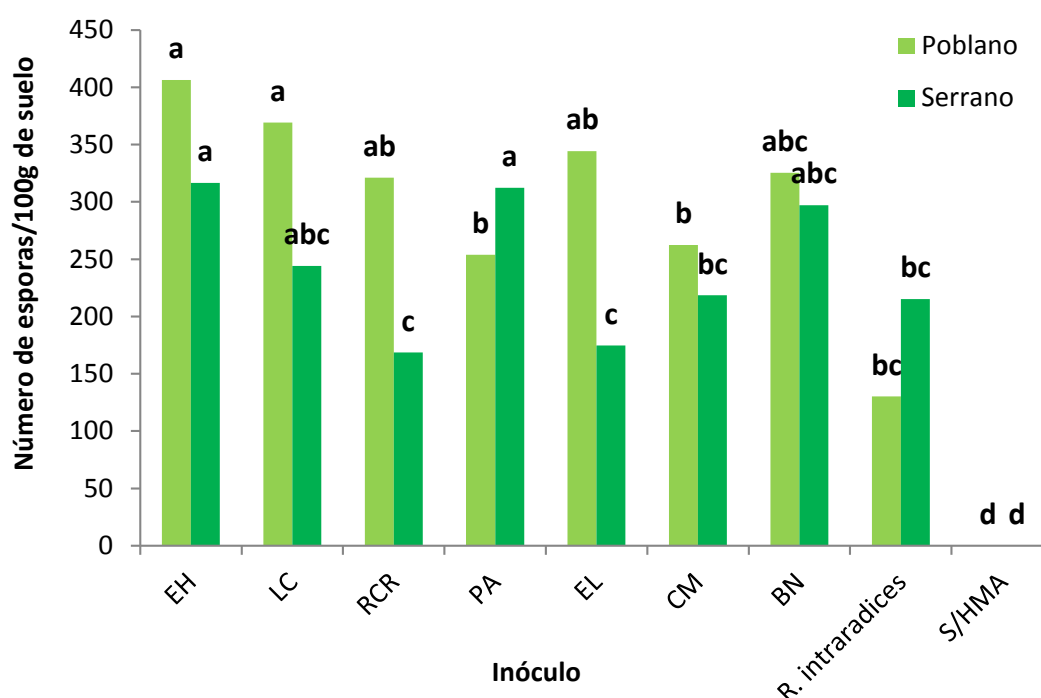


Figura 47. Número de esporas en 100 g de suelo seco en chile serrano y poblano, 56 días después de establecido el experimento. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

3.7.4 Bioprotección por micorrización contra *Phytophthora capsici*

Después de la inoculación de *Phytophthora capsici*, todas las plantas presentaron síntomas de la enfermedad, sin embargo el grado de severidad dependió del consorcio micorrízico inoculado. El análisis no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en chile serrano (Estadístico = 15,6042, valor-P = 0,0484086) y poblano (Estadístico = 15,6959, valor-P = 0,0469459) para la comparación visual en base a la escala de virulencia. En chile serrano la mayoría de los inóculos de HMA a excepción de CM no lograron ejercer efecto bioprotector contra la severidad de la enfermedad, encontrándose que las plantas de esos tratamientos fueron estadísticamente iguales y las plantas se enfermaron en el mismo nivel de severidad que el control negativo (sin HMA) (Figuras 48 y 49).



Figura 48. Nivel de severidad con base en la escala de virulencia en plantas de chile serrano a 21 días después de la inoculación de *Phytophthora capsici*. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes de acuerdo a Dunn ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

Las plantas inoculadas con CM presentaron menor nivel de severidad de la enfermedad también en chile poblano (Figuras 51 y 52), de acuerdo a la escala estas plantas se encontraron con un índice de severidad de 1 lo que se reflejó en plantas con hojas parcialmente colapsadas con el tallo erguido (Figuras 49 y 52). Esto demuestra que el consorcio micorrízico CM es capaz de bioproteger las plantas de chile contra *Phytophthora capsici* al disminuir la severidad de la enfermedad observada en condiciones de invernadero. Esto concuerda con lo reportado por Ozgonen y Erkilic (2007) quienes al inocular esporas de *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum* y *Gigaspora margarita* en plantas de chile encontraron una disminución de la enfermedad provocada por *Phytophthora capsici* de hasta un 91.7% en condiciones de invernadero y 57.2% en condiciones de campo. Éste efecto bioprotector se atribuyó a una mayor concentración de la fitoalexina capsidiol en las plantas micorrizadas principalmente en aquellas con menor severidad de la enfermedad. La síntesis de fitoalexinas está documentada como una respuesta de la planta al ataque de fitopatógenos donde se encuentran implicados el ácido jasmónico y el etileno que propician una resistencia sistémica que puede ser inducida por

microorganismos benéficos para la planta como los HMA (Carreón-Abud *et al.*, 2008). Por su parte Gómez-Dorantes *et al.* (2008), atribuyeron la reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici* en jitomate a una mejora en el estatus nutricional de las plantas y a la competencia por compuestos de carbono. Considerando estos resultados es posible que el efecto bioprotector encontrado en este estudio por parte de los HMA, reflejado en una menor severidad de la enfermedad, se deba entre otros aspectos a la inducción de señalización bioquímica para dar respuestas de defensa propiciadas por la actividad de fitohormonas como los ácidos salicílico y jasmónico (Kapoor, 2008; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). Este efecto bioprotector ha sido reportado en plantas de tomate donde la inoculación con *Glomus mosseae* indujo una respuesta sistémica contra *Phytophthora parasitica* en un sistema de raíz dividida, donde la resistencia fue asociada a la acumulación de compuestos fenólicos, engrosamiento de la pared celular y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-1) (Cordier *et al.*, 1998). La respuesta sistémica en tomate frente a *P. parasitica* también fue reportada por Pozo *et al.* (1999) donde se encontraron isoformas de enzimas hidrolíticas como quitinasas, quitosanasas, glucanasas y peróxido dismutasas posiblemente relacionadas con esta respuesta. La protección contra PC mediante la síntesis de proteínas PR con actividad peroxidasa se ha reportado en plantas de chile inoculadas con *Trichoderma harzianum*, donde la colonización por el antagonista induce resistencia sistémica que puede desencadenar el mecanismo de defensa hipersensible (Ezziyyani *et al.*, 2005). Por otro lado Cameron *et al.* (2013) propusieron un modelo de resistencia inducida por micorrización (MIR), como resultado de un efecto acumulativo entre la resistencia asociada directamente a la micorrización y una respuesta indirecta del sistema inmune relacionada con la inducción de resistencia sistémica (ISR) por rizobacterias en la micorrizósfera. Esto refleja que el efecto bioprotector por micorrización podría estar asociado a la interacción indirecta con microorganismos benéficos presentes en la micorrizósfera capaces de inducir resistencia sistémica.



Figura 49. Severidad de la enfermedad en plantas de chile serrano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Las Campesinas (LC), Cerro del Metate (CM), Sin HMA (S/HMA).

Respecto a la biomasa fresca aérea y radical, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En chile serrano (Figura 50), el inóculo CM obtuvo la mayor biomasa fresca aérea 15.4 g siendo estadísticamente superior al control negativo (S/HMA) que registró 8.26 g. Para chile poblano (Figura 53) la tendencia fue igual, las plantas inoculadas con CM3 mostraron una biomasa fresca aérea de 7.95 g y diferente estadísticamente a tratamientos sin HMA (2.83 g). En la biomasa fresca radical los diferentes consorcios de HMA incluyendo a CM3, no lograron promover el crecimiento radical puesto que en ambas variedades de chile fueron estadísticamente iguales al control negativo sin HMA, esto difiere de la literatura reportada, donde se menciona que la micorrización incrementa la biomasa radical (Ursuga-Osorio *et al.*, 2008).

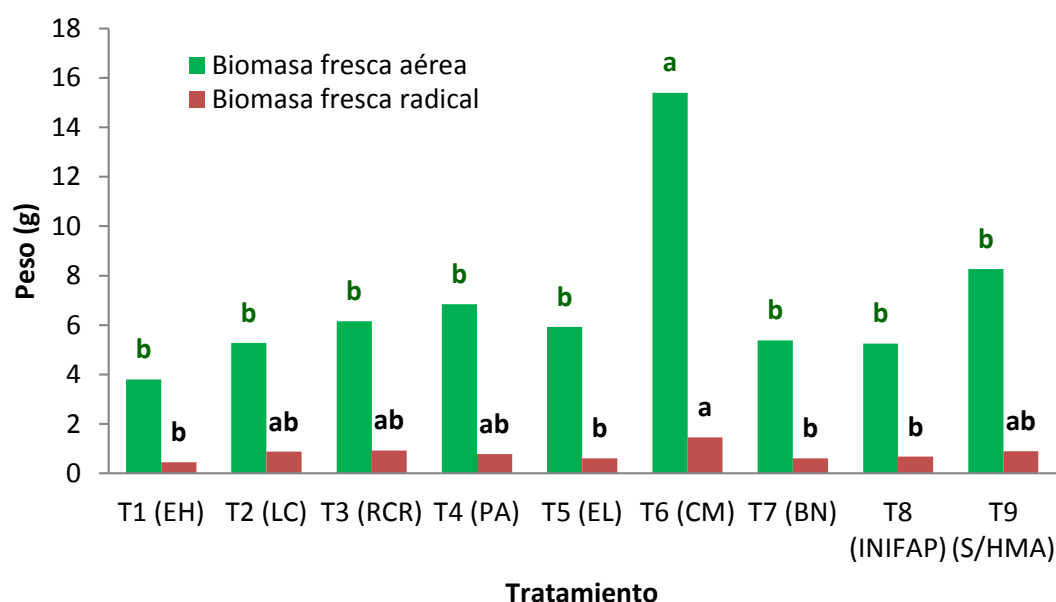


Figura 50. Biomasa fresca aérea y radical de plantas de chile serrano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

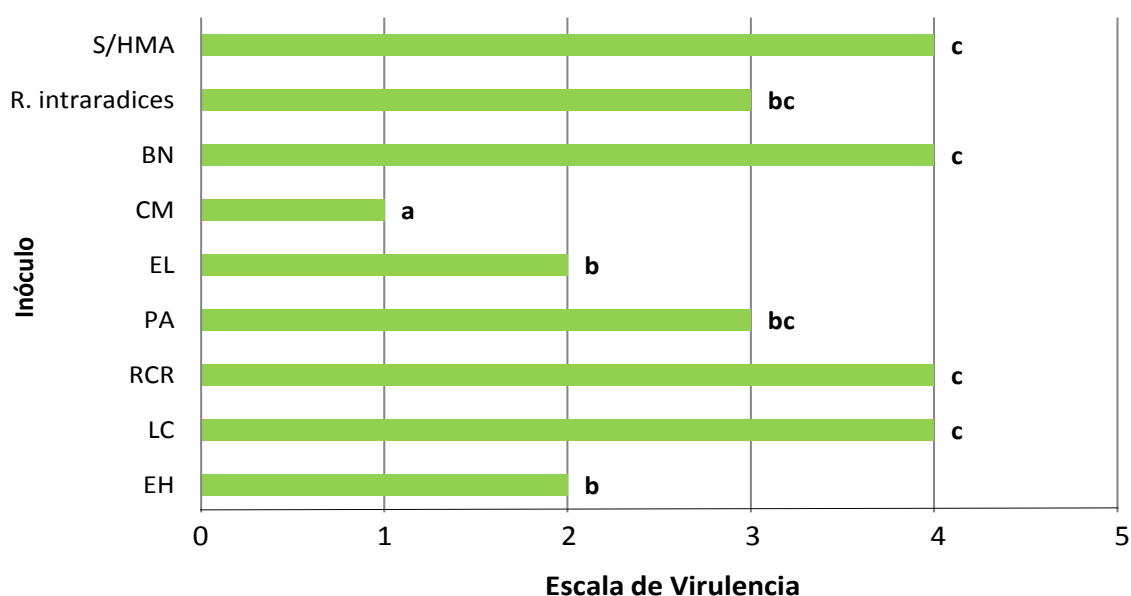


Figura 51. Nivel de severidad en base a la escala de virulencia en plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Letras diferentes representan tratamientos estadísticamente diferentes de acuerdo a Dunn ($p < 0.05$). El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).



Figura 52. Daño en plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Tratamientos: CM, S/HMA y RCR. Rancho Carlos Rojas (RCR), Cerro del Metate (CM), Sin HMA (S/HMA).

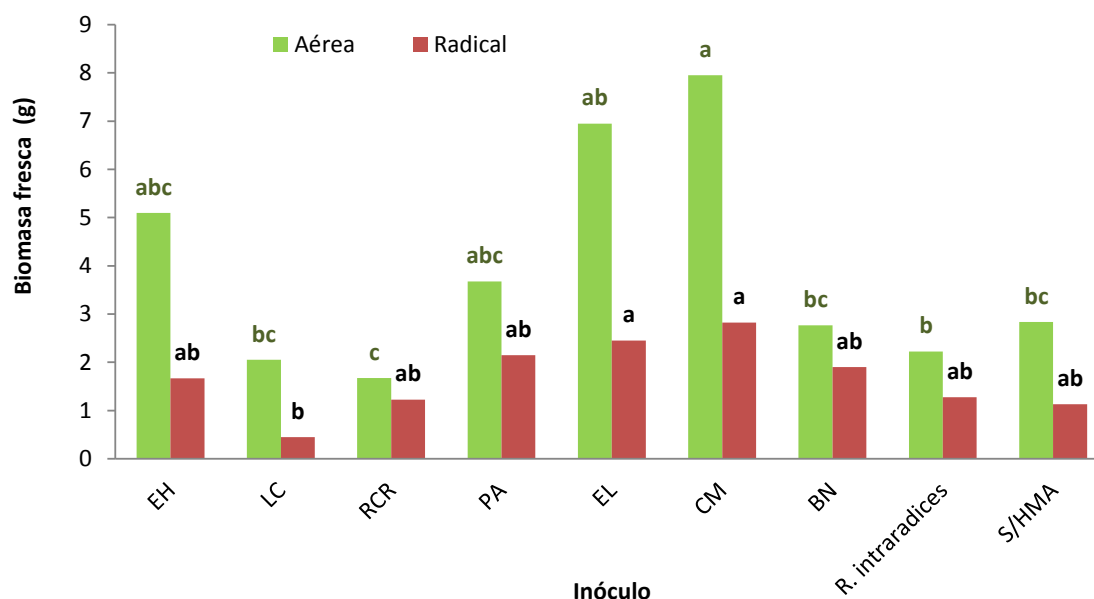


Figura 53. Biomasa fresca aérea y radical de plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici*. El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El Limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), Sin HMA (S/HMA).

3.8 CONCLUSIONES

La micorrización en plantas de chile serrano y poblano favoreció un incremento en el crecimiento reflejado en una mayor altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, biomasa fresca aérea y radical. El consorcio micorrízico CM fue capaz de disminuir la severidad de la marchitez al ser inoculado al momento del trasplante en plantas de chile serrano y poblano bajo condiciones de invernadero, por lo que podría ser empleado en el biocontrol del fitopatógeno.

3.9 LITERATURA CITADA

- Alonso-Contreras R., L. I. Aguilera-Gómez, M. Rubí-Arriaga, A. González-Huerta, V. Olalde-Portugal y I. V. Rivas-Manzano. 2013. Influencia de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y desarrollo de *Capsicum annuum* L. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4: 77-88.
- Alejo I, F., M. A. Márquez L., I. Morales R., M. Vázquez G., y V. Olalde P. 2008. Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. European Journal Plant Pathology 120: 13-20.
- Armenta-Bojórquez A. D., C. García-Gutiérrez, J. R. Camacho-Báez, M. A. Apodaca-Sánchez, L. G. Montoya y E. Nava-Pérez. 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai 6: 51-56.
- Azcón-Aguilar C. and J. M. Barea. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6: 457- 464.
- Cameron, D. D., A. L. Neal, S. C. M. VanWees and J. Ton. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts?. Trends in Plant Science 18: 539-545.
- Carreón-Abud Y., N. Gómez-Dorantes y M. Martínez-Trujillo. 2008. Las micorrizas arbusculares en la protección vegetal. Biológicas 10: 60-70.
- Cordier, C., M. J. Pozo, J.M. Barea, S. Gianinazzi and V. Gianinazzi-Pearson. 1998. Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasítica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. Molecular Plant–Microbe Interactions 11:1017-1028.
- Díaz-Franco A., M. Alvarado-Carrillo, F. Ortiz-Chairez y O. Grageda-Cabrera. 2013. Nutrición de la planta y calidad de fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4: 315-321.
- Espinosa-Victoria D., D. González-Mendoza, J. Placencia-de la Parra, y R. García-Espinosa. 2004. Reducción de la incidencia de *Phytophthora*

- capsici* Leo en el sistema radical de plántulas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intrarradices*. Terra Latinoamericana 22: 317-326.
- Ezziyyani, M., M. E. Requena y M. E. Candela. 2005. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*. Rev. Anales de Biología 27:143-153.
- Fernández H, E., R. M. Acosta, G. F. Ponce y P. V. Manuel. 2006. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schelechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en Jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología 25: 35-42.
- Gerdemann J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46: 235-244.
- Gómez-Dorantes, N., Y. Carreón A, y S. P. Fernández P. 2008. Reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici* Leonian causante de la pudrición de raíz en jitomate (*Solanum lycopersicum* L). Biológicas 10: 100-108.
- Haneef K, M., M. K. Meghvansi, V. Panwar, H. K. Gogoi and L. Singh. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi-induced signalling in plant defence against phytopathogens. Journal of Phytology 2: 53-69.
- Kapoor, R. 2008. Induced resistance in mycorrhizal tomato is correlated to concentration of jasmonic acid. J. Biol. Sci. 8:49-56.
- Lioussanne L. 2010. Review. The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. Spanish Journal of Agricultural Research 8: 51-61.
- Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas 63: 22-32.

- Mendoza R. E., V. Goldmann, J. Rivas, V. Escudero, E. Pagani, M. Collantes y L. Marbán. 2002. Poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares en relación con las propiedades del suelo y de la planta hospedante en pastizales de Tierra del Fuego. *Ecología Austral* 12: 105-116.
- McGonigle T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild and A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology* 115: 495-501
- Ozgonen H. and A. Erkilic 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Elsevier, Crop Protection* 26: 1682-1688.
- Phillips, J.M. y D.S. Hayman 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-160.
- Pozo, J. M., C. Azcón-Aguilar, E. Dumas-Gaudot, and J.M. Barea. 1999. β -1, 3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* 141:149-157.
- Pozo, M. J. and Azcón-Aguilar, C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393-398.
- Quinto-Álvarez, Carla Paola. 2014. Nuevas alternativas de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. causante de la marchitez en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis para obtención de grado de Maestría en producción Agropecuaria con opción terminal agrícola. UMSNH.
- Ristaino J. B. 1990. Intraespecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. *Phytopathology* 80: 1253-1259.
- Rivera-Espinoza R.A., J.V. Martín-Cárdenas, A. Calderón-Puig y A. Torrez-Hernández. 2011. Utilización de cepas eficientes de hongos micorrízicos

arbusculares en el desarrollo de portainjertos de aguacate en un sustrato suelo-cachaza. Cultivos tropicales 32: 172-183.

Rosa-Mera C., R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón, M. J. Sánchez-Colín y A. Franco-Ramírez. 2012. Aislamiento de consorcios de hongos micorrízicos arbusculares de plantas medicinales y su efecto en el crecimiento de vinca (*Catharanthus roseus*). Revista Chilena de Historia Natural 85: 187-198.

Smith S. E. y D. I. Read 2008. Mycorrhizal simbiosis. Tercera edición. Academic Press, San Diego, California, USA. 637 pp.

Tapia-Goné J. J., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela-Fregoso, J. C. Rodríguez-Ortíz, J. C. Soria-Colunga, M. A. Tiscareño-Iracheta, C. Loredó-Ostí, J. Alcalá-Jáuregui y C. Villar-Morales. 2010. Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*), Revista Mexicana de Micología 31: 69-74.

Torres E., J. Iannaccone y H. Gómez. 2008. Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Bragantia, Campinas 67: 169-178.

Trotta A., G. C. Varese, E. Gnani, A. Fusconi, S. Sampo, and G. Berta. 1996. Interactions between the soil-borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *Parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. Plant and Soil 185: 199–209.

Ursuga-Osorio, C. E., D. A. Castañeda-Sánchez, A. E. Franco-Molano, F. A. Gómez-Velásquez y C. A. Lopera-Agudelo. 2008. Efecto de la micorrización y la fertilización en la acumulación de biomasa en plantas de banana (*Musa* AAA cv. Gran Enano) (Musaceae). Rev. Fac. Agr. Medellín. 61(1):4269-4278.

Vázquez B., R. Rivera, K. Fernández y Y. Rodríguez. 2010. Caracterización del comportamiento micorrízico en *Brachiaria decumbens* inoculada con *Glomus hoi-like*. Cultivos Tropicales 31: 01-10.

Walker C. 1997. Spore extraction by centrifugation-sugar flotation. Internal document, biological research and imaging laboratory. New Milton, Hampshire: UK.

CAPÍTULO 4

BIOPROTECCIÓN POR HMA Y ACTINOMICETOS EN PLANTAS DE CHILE POBLANO CONTRA *Phytophthora capsici* L.

4.1 RESUMEN

Phytophthora capsici es el agente causal de la principal enfermedad del cultivo de chile a nivel mundial. El desarrollo de estrategias de control, alternativas dentro del marco de la agricultura sustentable ha tomado gran interés. Una estrategia de control de enfermedades es el control biológico el cual se define como el uso de microorganismos antagonistas contra agentes fitopatógenos, dos de ellos son los HMA y los actinomicetos. Con el objetivo de evaluar la inoculación de los HMA y los actinomicetos en la promoción del crecimiento y disminución de la severidad de la marchitez en plantas de chile poblano, se desarrolló un diseño factorial en bloques completos al azar. Se evaluó el factor HMA con dos niveles: Cerro del Metate (CM) y Sin HMA (S/HMA); el factor actinomiceto con cuatro niveles (ABV39, ABV02, ABV39-ABV02 combinados y sin actinomiceto (S/ACT) y el factor *Phytophthora capsici* con dos niveles (CH11 y S/PC). Previamente se estableció una escala cualitativa ordinal de virulencia por marchitez en plantas de chile poblano para comparar la severidad de la enfermedad resultante del experimento sobre bioprotección. La inoculación de los HMA se realizó al momento del trasplante, los actinomicetos se inocularon a los 52 días después del trasplante (DDT) y finalmente el fitopatógeno a los 62 DDT. Las variables de respuesta fueron: de crecimiento: altura de planta (AP), diámetro del tallo (DT) y número de hojas (NH); microbiológicas: porcentaje de colonización micorrízica (a los 50 y 82 DDT), número de esporas de HMA (a los 50 y 82 DDT), porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora capsici* y unidades formadoras de colonias (UFC) de actinomicetos (a los 82 DDT). Al final del experimento se realizó un muestreo destructivo para evaluar el nivel de severidad de la marchitez con una escala de virulencia ordinal, además se registró la biomasa fresca y seca de raíz, tallo, hojas, fruto y total; área foliar y volumen radical. A los datos se les realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza, para el nivel de severidad de la enfermedad se

realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn con 95% de confianza. Se realizó un análisis de correlación (Pearson) entre las variables evaluadas. Se encontró que las plantas micorrizadas con el inóculo CM tuvieron un mayor crecimiento con respecto al control sin HMA ni actinomicetos. El tratamiento CM-39-S/PC registró los mayores valores en altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas (26.12 cm, 5.29 mm y 35.12 hojas, respectivamente). En los resultados de biomasa fresca y seca total y área foliar evaluados al final del experimento, en plantas donde se coinoculó CM y alguna de las dos cepas de actinomicetos (AVB39 o ABV02) registraron los mayores valores y fueron estadísticamente superiores a los controles. El nivel de severidad de la enfermedad en plantas donde se inoculó CM y alguno de los dos actinomicetos se redujo hasta un nivel de dos (2) de acuerdo a la escala de virulencia. En conclusión, se encontró un efecto sinérgico en la coinoculación de HMA y actinomicetos reflejado en la promoción del crecimiento vegetal y en la bioprotección dado la disminución de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici*.

4.2 ABSTRACT

Phytophthora capsici is the main causal agent of disease on chili crop in the world. The development of strategies control alternative within of sustainable agriculture has taken great interest. A strategy for disease control is biological control which is defined as the use of antagonistic microorganisms against plant pathogens, two of them are the AMF and actinomycetes. In order to evaluate the AMF inoculation and actinomycetes in the promotion of growth and decreased of severity of wilt on poblano chili plants, a factorial design in randomized complete block was developed. The AMF factor was evaluated with two levels: Cerro of Metate (CM) and without AMF (W/AMF); the actinomycete factor with four levels (ABV39, ABV02, ABV39-ABV02 and without actinomycete (W/ACT) and *Phytophthora capsici* factor with two levels (CH11 and W/PC). Previously a virulence ordinal qualitative scale by wilting on poblano chili plants was established to compare the severity of disease generate from the bioprotection experiment. The AMF inoculation was performed at the transplant; and 52 days after transplanting (DAT) the

actinomycetes were inoculated, finally at 62 DAT the phytopathogen was applied. The response variables, of growth were: height plant (HP), diameter stem (DS) and number of leaves (NL); as microbiological response, mycorrhizal colonization percentage and, AMF spores number at 50 and 82 DAT, root infection percentage by *Phytophthora capsici* and actinomycetes colony forming units (CFU) at 82 DAT. At the end of the experiment, a destructive sampling was performed to assess the severity level of wilt with a virulence ordinal scale was performed, likewise the fresh biomass and dry of root, stem, leaves, fruit and total; leaf area and root volume were recorded. Data were performed to analysis of variance and test comparison of Tukey with 95% of confidence, for the disease severity level a nonparametric analysis of Kruskal-Wallis and test Dunn with 95% confidence were performed. A correlation analysis (Pearson) between the evaluated variables was determined. It was found that plants with CM mycorrhizal inoculum had higher growth compared to the control without AMF or actinomycetes. The CM-39-S/PC treatment recorded the highest values in height plant diameter stem and number of leaves (26.12 cm, 5.29 mm and 35.12 leaves, respectively). In the results of fresh and dry total biomass and leaf area evaluated at the end of the experiment, in plants where CM and the two strains of actinomycetes (AVB39 or ABV02) were coinoculated, the highest values were recorded and were statistically superior to the controls. The disease severity level in plants inoculated with CM and one of the two actinomycetes decreased to a level two, according to the virulence scale. In conclusion, a synergistic effect was found in the co-inoculation whit AMF and actinomycetes was found, reflected in plant growth promoting and bioprotection according to decreasing of wilt caused by *Phytophthora capsici*.

4.3 INTRODUCCIÓN

Además del beneficio nutricional que le confieren a las plantas los HMA, son microorganismos antagonistas a diversos agentes fitopatógenos de la raíz y son capaces de proteger a la planta por medio de diferentes mecanismos de acción directa e indirecta. Entre los mecanismos de acción directa se encuentra la competencia por espacio y nutrimentos en la rizósfera y las raíces de las

plantas, creando una barrera protectora que impide el paso de los fitopatógenos hacia la micorrizósfera permitiendo el establecimiento de otros microorganismos benéficos (Lioussane, 2010). Entre los mecanismos indirectos de los HMA en la bioprotección de las plantas está la resistencia sistémica inducida (RSI) (Haneef *et al.*, 2010), por medio de la cual la planta entra en un estado de alerta, donde maximiza el encendido de sus mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque de fitopatógenos cuando infecten en cualquier área o tejido vegetal.

Por otro lado, los actinomicetos son bacterias Gram-positivas que se consideran bacterias promotoras del crecimiento vegetal debido a que son solubilizadores y mineralizadores de nutrientes orgánicos (lo que favorece su asimilación por las plantas, Franco-Correa, 2008), además de producir fitohormonas. Al igual que los HMA, los actinomicetos además de los beneficios nutricionales que confiere su presencia en la rizósfera de las plantas, tienen la capacidad de producir una gran diversidad de antibióticos y compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento de ciertos microorganismos fitopatógenos (Medina-Cuevas y Evangelista-Martínez, 2011). Entre estos está la producción de sideróforos y enzimas que inhiben la germinación de esporas y el crecimiento de ciertos hongos y oomicetes. Por lo anterior en la actualidad su aplicación biotecnológica en el control de enfermedades de plantas está cobrando un mayor interés al descubrirse nuevas cepas con actividad antimicrobiana de amplio espectro sobre diversos fitopatógenos.

Por otro lado, se sabe que los HMA, favorecen el establecimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal entre ellos actinomicetos, lo que propicia a su vez un ambiente desfavorable para el establecimiento de agentes fitopatógenos (Franco-Correa *et al.*, 2010). En base a lo anterior, la aplicación conjunta de HMA y actinomicetos como agentes de control biológico puede ser una alternativa prometedora en búsqueda de un efecto sinérgico que potencialice el control de enfermedades de plantas. Sin embargo, no se reportan estudios sobre el uso combinado de éstos grupos de microorganismos en el control biológico de fitopatógenos, únicamente existen estudios sobre el

beneficio nutricional de la interacción HMA-actinomiceto en plantas de trébol (Gómez-Vargas *et al.*, 2011).

Por lo cual en este trabajo se evaluó el efecto bioprotector de la co-inoculación de HMA y actinomicetos en plantas de chile contra la marchitez causada por *Phytophthora capsici*.

4.4 HIPÓTESIS

La aplicación conjunta de HMA y actinomicetos promueve un efecto bioprotector sobre la marchitez causada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile.

4.5 OBJETIVOS

4.5.1 General

- Evaluar la inoculación de HMA y actinomicetos en la promoción del crecimiento y disminución de la severidad de la marchitez en plantas de chile.

4.5.2 Específicos

- Establecer una escala cualitativa ordinal de virulencia con base en la observación visual de la sintomatología de plantas de chile.
- Evaluar el efecto de la inoculación de HMA y actinomicetos en el crecimiento de plantas de chile.
- Evaluar el nivel de severidad ocasionado por *Phytophthora capsici* en base a la comparación visual con una escala de virulencia en plantas de chile micorrizadas y/o inoculadas con actinomicetos.

4.6 METODOLOGÍA

4.6.1 Propuesta de escala de severidad de *Phytophthora capsici* en plantas de chile.

a) Diseño experimental.

Se realizó un diseño experimental completamente al azar evaluando dos tratamientos: con y sin inoculación de *Phytophthora capsici*. Se utilizaron plantas de chile sin inóculo de *Phytophthora capsici* (libres de la enfermedad): el otro tratamiento consistió en la inoculación de la cepa CH11 de *Phytophthora*

capsici en una planta de chile en maceta (unidad experimental). El experimento se desarrolló en condiciones de invernadero y se utilizaron 25 plantas de chile donde se inoculó el fitopatógeno, y 25 plantas controles para un total de 50 unidades experimentales.

b) Germinación y sustrato.

Las semillas de chile poblano se colocaron en charolas de germinación con arena esterilizada (120°C / 3 h). Al momento que las plantas presentaron homogeneidad en el crecimiento y contaban con cuatro hojas verdaderas se trasplantaron a macetas de 470 mL de capacidad que contenían una mezcla de arena y suelo esterilizada (120°C / 3 h) en proporción 1:1 (v/v). Se realizaron riegos periódicos a capacidad de campo cada dos días.

c) Inoculación de *Phytophthora capsici*.

Se preparó una suspensión de zoosporas de la cepa CH11 a una concentración de 1×10^4 zoosporas mL⁻¹, Ristaíno (1990). Se colocó 1 mL de la suspensión en la base del tallo de cada una de las 25 plantas de chile poblano correspondientes.

d) Registro de la sintomatología.

Después de cuatro días de la inoculación con *Phytophthora capsici*, se registró la sintomatología que mostraron las plantas. Se tomó en cuenta los síntomas visuales como: caída de hojas, hojas enrolladas y marchitas, hojas cloróticas, presencia de necrosis en las raíces, necrosis en la base del tallo y de hojas y finalmente la muerte de la planta. Para lo anterior se hicieron muestreos destructivos donde se eliminaron diariamente dos plantas infectadas con *Phytophthora capsici* y dos plantas controles para comparar la severidad de la enfermedad a nivel radical en plantas sanas y enfermas.

e) Escala de severidad.

Con base en la sintomatología de la enfermedad, se propuso una escala cualitativa ordinal de severidad con seis niveles (0-5) los cuales contemplan desde planta sana a planta muerta.

4.6.2 Experimento de evaluación del crecimiento y bioprotección por HMA y actinomicetos contra *Phytophthora capsici*

a) Diseño experimental

Se desarrolló un diseño experimental en bloques completos al azar bajo condiciones de invernadero, donde se evaluaron tres factores (Cuadro 8): El factor HMA con dos niveles (CM y S/HMA), el factor actinomiceto con cuatro niveles (ABV39, ABV2, ABV39-ABV2, S/ACT) y finalmente el factor *Phytophthora capsici* con dos niveles (CH11 y S/PC), resultando 16 tratamientos con ocho repeticiones para un total de 124 unidades experimentales (Cuadro 9).

Cuadro 8. Diseño de tratamientos del experimento sobre evaluación del crecimiento y bioprotección por HMA y actinomicetos contra *Phytophthora capsici*.

FACTORES			Tratamientos
HMA	ACTINOMICETO	<i>P. capsici</i>	
CM	ABV39	CH11	T1 CM-39-CH11
		S/PC	T2 CM-39-S/PC
	ABV02	CH11	T3 CM-02-CH11
		S/PC	T4 CM-02-S/PC
	ABV39-ABV02	CH11	T5 CM-(39-02)-CH11
		S/PC	T6 CM-(39-02)-S/PC
	S/ACT	CH11	T7 CM-S/ACT-CH11
		S/PC	T8 CM-S/ACT-S/PC
S/HMA	ABV39	CH11	T9 S/HMA-39-CH11
		S/PC	T10 S/HMA-39-S/PC
	ABV02	CH11	T11 S/HMA-02-CH11
		S/PC	T12 S/HMA-02-S/PC

ABV39-ABV02	CH11	T13 S/HMA-(39-02)-CH11
	S/PC	T14 S/HMA-(39-02)-S/PC
S/ACT	CH11	T15 S/HMA-S/ACT-CH11
	S/PC	T16 S/HMA-S/ACT-S/PC

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02 combinados), S/ACT (Sin actinomiceto), S/PC (Sin *Phytophthora capsici*), CH11 (cepa de *Phytophthora capsici*).

Cuadro 9. Diseño experimental de bloques completos al azar.

Bloques							
B6	B3	B1	B7	B2	B8	B5	B4
T11	T8	T7	T13	T6	T3	T12	T16
T5	T6	T5	T14	T9	T16	T5	T12
T4	T2	T9	T3	T16	T6	T7	T11
T2	T5	T10	T6	T3	T10	T14	T15
T14	T7	T1	T9	T15	T11	T13	T1
T15	T4	T13	T5	T13	T9	T11	T10
T6	T15	T6	T12	T8	T13	T2	T13
T1	T16	T14	T10	T2	T14	T4	T9
T12	T10	T11	T7	T14	T1	T9	T8
T10	T12	T12	T16	T1	T12	T16	T2
T13	T9	T8	T1	T7	T8	T6	T7
T7	T1	T16	T11	T11	T5	T8	T14
T8	T14	T3	T15	T5	T15	T15	T4
T16	T13	T4	T8	T10	T4	T1	T6
T9	T3	T2	T2	T4	T7	T3	T5
T3	T11	T15	T4	T12	T2	T10	T3

B (Bloque), T (Tratamiento).

Las cepas de actinomicetos evaluados fueron: ABV39 y ABV02, éstas cepas fueron seleccionadas por mostrar una inhibición del crecimiento de *Phytophthora capsici* en condiciones *in vitro*, tener gran capacidad para esporular y ser compatibles entre sí. El consorcio micorrízico CM fue seleccionado por haber mostrado un efecto en la reducción de la severidad de la marchitez en las plantas de chile poblano y serrano al ser inoculadas con *Phytophthora capsici*.

b) Establecimiento del experimento

- Germinación de semillas.

Se germinaron semillas de chile poblano cultivar San Luis, en charolas de aluminio con arena esterilizada (120°C / 3h). Las semillas se colocaron bajo condiciones de invernadero donde germinaron a los 12 días después de la siembra.

- Trasplante e inoculación de HMA.

Las plántulas de chile poblano, se trasplantaron cuando tenían dos hojas verdaderas (30 días después de la siembra), en recipientes de unicel de 500 mL de volumen utilizando como medio de crecimiento una mezcla de suelo arena 1:1 (v/v) esterilizada (120°C / 3 h). El inóculo de HMA consistió de 80 esporas contenidas en 14.5g de arena proveniente de macetas trampa. El inóculo se aplicó en el sistema radical de la plántula al momento del trasplante.

- Inoculación de actinomicetos.

Los actinomicetos ABV39 y ABV02 se inocularon a 52 días después del trasplante. Se desarrolló una suspensión de unidades formadoras de colonias (UFC) las cuales fueron obtenidas a partir de cultivos puros. La suspensión fue ajustada a una concentración de 1.5×10^8 UFC mL de acuerdo a la escala de McFarland. En los tratamientos correspondientes se inocularon 33.3 mL de la suspensión (1.5×10^8) en el sustrato (500 g) de tal forma que por cada gramo de sustrato se inocularon 1×10^7 UFC mL. Para el caso de la aplicación combinada de ambos actinomicetos se colocaron 16.7 mL de suspensión de cada cepa. La inoculación se realizó en la base del tallo de las plantas de chile poblano, previamente se colocó 1% de materia orgánica (vermicomposta) como bioestimulante para los actinomicetos.

- Inoculación de *Phytophthora capsici*.

La inoculación de *Phytophthora capsici* (cepa CH11) se realizó a 62 días después del trasplante. Para esto, se aplicó 1 mL de una suspensión de

zoosporas a una concentración de 1×10^4 zoosporas mL. Las plantas se inundaron durante 24 h para favorecer la infección del fitopatógeno.

c) Variables evaluadas

- Variables de crecimiento.

Se midieron cada 14 días durante nueve semanas (hasta 70 días después del trasplante) las siguientes variables de crecimiento:

- Altura de planta.

Se midió con un vernier digital desde la base del tallo hasta la base de las hojas más jóvenes.

- Diámetro del tallo.

Se midió en la base del tallo con un vernier digital, aproximadamente a dos milímetros del sustrato.

- Número de hojas.

Se contaron a partir de las hojas verdaderas desde la base hasta las más jóvenes que presentaban una longitud mayor a un centímetro.

- Variables microbiológicas.

Cincuenta días después del trasplante, con ayuda de un sacabocados (1.5 cm Ø) se obtuvieron muestras de suelo y raíces de cada una de las unidades experimentales, con esas muestras se midieron las variables microbiológicas siguientes:

- Colonización micorrízica.

Se desarrolló el método de clareo y tinción de raíces de Phillips y Hayman (1970). Posteriormente se colocaron 30 segmentos de 1 cm de raíz teñida en un portaobjetos para la observación de estructuras características de los HMA: micelio intrarradical, vesículas, arbusculos y esporas, (lo anterior se realizó por triplicado). La determinación del porcentaje de colonización micorrízica se

realizó por el método descrito por McGonigle *et al.* (1990) mediante la siguiente fórmula:

$$\% CM = \frac{\text{Número de segmentos micorrizados}}{\text{Número total de segmentos}} (100)$$

Dónde: %CM = porcentaje de colonización micorrízica

- Número de esporas de HMA.

Para la extracción de esporas se utilizó la técnica de tamizado húmedo y decantación de Gerdemann y Nicholson (1963) en combinación con la técnica de flotación en azúcar en gradiente de sacarosa descrita por Walker (1997). El conteo de esporas se realizó en un microscopio estereoscópico con ayuda de un contador manual, se contabilizó el número total de esporas presentes en 100 g de suelo seco mediante la siguiente fórmula:

$$NE = \frac{\text{Número de esporas contabilizadas}}{\text{g de suelo seco}} (100)$$

Dónde: NE = número de esporas de HMA

d) Variables evaluadas al final del experimento

Ochenta y dos días después del trasplante, en el momento en que los controles negativos (con presencia sólo del fitopatógeno) llegaron al nivel cinco de severidad (planta muerta), se procedió al registro de las siguientes variables morfológicas y microbiológicas:

- Biomasa fresca.

Se registró el peso fresco en gramos (g) de hojas, tallo, raíz y fruto de forma separada, con ayuda de una balanza analítica Mettler Toledo AT200.

- Biomasa seca.

Las muestras frescas se envolvieron en papel aluminio para posteriormente introducirse en un horno de secado durante dos días a 65°C, después se determinó el peso en gramos del tallo, raíz, hojas y fruto.

- Volumen radical.

Se registró el volumen radical mediante volumen desplazado, sumergiendo las raíces en una probeta graduada (250 mL) con agua destilada, utilizando como base 200 mL, el resultado se expresó en mL.

- Área foliar.

Se determinó el área foliar en centímetros cuadrados (cm²) utilizando un planímetro marca LI-COR modelo LI-3100.

- Severidad de la enfermedad.

De acuerdo a la sintomatología de las plantas, se determinó el nivel de severidad de la enfermedad de acuerdo a la escala de virulencia desarrollada en este trabajo. A cada planta infectada con el fitopatógeno se le asignó un valor de acuerdo al nivel de severidad.

- Colonización micorrízica.

Se determinó con la metodología descrita en el apartado 4.6.2.3.6 de éste trabajo.

- Número de esporas de HMA.

Se determinó con la metodología descrita en el apartado 4.6.2.3.7 de éste trabajo.

- Porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora capsici*

Se obtuvieron muestras de raíz de las plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* y se desinfectaron con una solución de cloro comercial al 10 %. Posteriormente, se cortaron en segmentos de un centímetro de longitud que se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo (PDA), se colocaron 20 segmentos de raíz por caja de cultivo. Después de tres días se registró el porcentaje de raíces infectadas en base al número de segmentos donde creció el fitopatógeno respecto al total de segmentos.

- Unidades formadoras de colonias de actinomicetos.

A partir de 10 g de sustrato se realizaron diluciones seriadas con agua destilada estéril en tubos de ensayo hasta 10^{-4} . Posteriormente se sembraron 300 μ l de la dilución 10^{-4} en PDA a pH 9. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Después de 14 días se registró el número de colonias en cada placa, se eliminó el factor de dilución (a la inversa) para determinar las UFC por gramo de sustrato.

4.6.3 Análisis estadístico

Con las variables de crecimiento y las variables microbiológicas se realizó un análisis de varianza con una significancia de 0.05, así como la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.II.

El nivel de severidad de la enfermedad al ser comparado con la escala de virulencia se sometió a un análisis no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. Para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos se desarrolló una gráfica de caja y bigotes aplicando la prueba de Dunn. Finalmente se realizó un análisis de correlaciones de Pearson entre todas las variables evaluadas en el paquete Statgraphics Centurion XV.II.

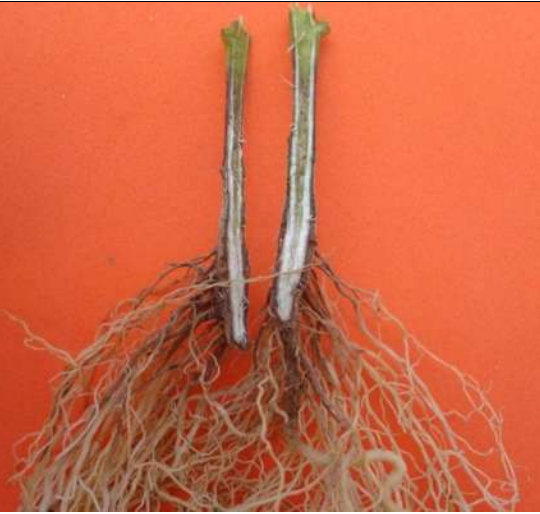
4.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.7.1 Escala de virulencia de la marchitez por *Phytophthora capsici*

Se estableció una escala cualitativa ordinal de virulencia de la marchitez por *Phytophthora capsici* con base en la sintomatología registrada en plantas de chile poblano cultivar San Luis (Cuadro 10). La escala contempló seis niveles (0-5) indicando distintas fases de severidad de la enfermedad. Los niveles de severidad comprendieron desde planta sana (nivel cero) hasta planta muerta (nivel cinco), los niveles de severidad intermedios (dos, tres y cuatro) se describieron con base en la sintomatología observada: hojas enrolladas, marchitas y porcentaje de hojas desprendidas, presencia y avance de necrosis en el tallo, raíz principal, raíces secundarias y haces vasculares. En la figura 54, se describen los niveles de severidad complementados con el registro fotográfico correspondiente.

Cuadro 10. Escala cualitativa ordinal de virulencia por *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano cultivar San Luis.

NIVEL	DESCRIPCIÓN	PLANTA EN MACETA	PLANTA COMPLETA	SISTEMA RADICAL
0	Planta sana, hojas turgentes y de color verde intenso, tallo erguido. Sistema radical sano y abundante, no se observa necrosis en haces vasculares.			
1	Planta con hojas encorvadas, y poco turgentes. Tallo con necrosis en la zona basal, visible únicamente realizando un corte longitudinal. Necrosis en la zona basal del tallo. (Marchitez leve).			

2	Planta con hojas encorvadas y poco turgentes, hasta un 20% de hojas desprendidas. Tallo con necrosis avanzada hasta un 20%. Necrosis en la zona basal las raíces secundarias y haces vasculares. (Marchitez moderada).			
3	Planta con hojas encorvadas y poco turgentes, hasta un 50% de hojas desprendidas. Tallo con necrosis en hasta un 40%. Necrosis en raíces secundarias y haces vasculares hasta en un 40% de su longitud (pérdida del 30% del sistema radical). La planta puede desprenderse del sustrato con facilidad. El crecimiento se detiene. (Marchitez avanzada).			

4	Planta con hojas muy encorvadas, poco turgentes y con más de 50% desprendidas. Necrosis del tallo mayor a un 50% de su longitud. Sistema radical con necrosis casi en su totalidad, (pérdida del 50% del volumen radical). La epidermis de las raíces se desprende con facilidad. Se observa tejido degradado en los haces vasculares. (Marchitez muy avanzada).			
5	Planta muerta. Hojas secas con un 90 a 100% desprendidas. Tallo con necrosis casi en su totalidad, rígido. Sistema radical necrótico, raíces con epidermis desprendida (pérdida del 70% del volumen radical). Se observa tejido degradado en los haces vasculares. (Marchitez severa).			

4.7.2 Experimento de evaluación del crecimiento y bioprotección por HMA y actinomicetos contra *Phytophthora capsici*

a) Variables de crecimiento

En el cuadro 11 se presentan los resultados registrados para: la altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas a los 70 días después del trasplante. En todas las variables se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). De manera general las plantas micorrizadas con el inóculo CM (tratamientos 1 al 8) presentaron mayor crecimiento, reflejado en las variables de AP, DT y NH, siendo estadísticamente iguales entre ellos, el tratamiento CM-39-S/PC registró la mayor altura de planta (26.12 cm), diámetro del tallo (5.29 mm) y número de hojas con 35, además de ser estadísticamente superior a los tratamientos donde no se inoculó el consorcio micorrízico ni actinomicetos (S/HMA-S/ACT-S/PC y S/HMA-S/ACT-CH11). Esto confirma la hipótesis de que la micorrización en plantas de chile poblano cultivar San Luis promueve el crecimiento durante su desarrollo, obteniendo plantas con mayor altura, diámetro del tallo y follaje. Lo cual concuerda con la hipótesis de que la micorrización incrementa el crecimiento vegetal en las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Alonso-Contreras *et al.*, 2013). En el caso particular del consorcio CM, este fue capaz de promover el crecimiento en las plantas de chile por lo que se demostró que es un recurso biológico a considerar para nuevos estudios en perspectiva de una aplicación en el cultivo de ésta especie vegetal en campo.

Por otro lado, se encontró que la presencia del actinomiceto ABV39 en el tratamiento donde se registraron los mayores valores en las variables de crecimiento, podría representar un posible efecto sinérgico en la promoción del crecimiento vegetal. En este sentido los resultados concuerdan con el estudio realizado por Gómez-Vargas y colaboradores (2011), donde encontraron que una cepa de *Streptomyces* sp. (MCR26) mineralizadora de fosfato actuaba de forma sinérgica con un HMA (*Glomus* sp.). Estos microorganismos incrementaron la concentración de fósforo a nivel foliar en plantas de *Trifolium repens* (Trébol blanco), lo que estimuló la producción de biomasa y colonización micorrízica en comparación con la inoculación separada de ambos

microorganismos. Con base en lo anterior, la cepa ABV39 podría estar actuando de modo similar con el consorcio CM. La combinación de estos microorganismos podría ser una estrategia prometedora en la búsqueda de potencializar el efecto promotor del crecimiento vegetal.

Cuadro 11. Altura, diámetro del tallo y número de hojas a los 70 días después del trasplante de chile poblano cultivar San Luis bajo condiciones de invernadero

Tratamiento	Altura de planta (cm)	Diámetro del tallo (mm)	Número de hojas
T1 CM-39-CH11	21.87 abc	4.98 abc	31.12 abcd
T2 CM-39-S/PC	26.12 a	5.29 a	35.12 a
T3 CM-02-CH11	23.81 ab	5.00 abc	35.25 a
T4 CM-02-S/PC	26.35 a	5.13 ab	35.14 ab
T5 CM-(39-02)-CH11	22.37 ab	4.99 abc	33.75 ab
T6 CM-(39-02)-S/PC	26.12 abc	5.10 ab	32.87 abc
T7 CM-S/ACT-CH11	23.75 ab	4.80 abcd	30.87 abcd
T8 CM-S/ACT-S/PC	22.62 abc	4.83 abcd	33.37 ab
T9 S/HMA-39-CH11	18.31 c	3.98 e	25.50 cde
T10 S/HMA-39-S/PC	20.64 bc	4.57 bcde	24.00 de
T11 S/HMA-02-CH11	21.25 abc	4.47 cde	27.37 bcde
T12 S/HMA-02-S/PC	20.43 bc	4.29 de	24.12 de
T13 S/HMA-(39-02)-CH11	20.00 bc	4.46 cde	20.57 e
T14 S/HMA-(39-02)-S/PC	20.64 abc	4.72 abcd	29.50 abcd
T15 S/HMA-S/ACT-CH11	20.12 bc	4.44 cde	20.87 e
T16 S/HMA-S/ACT-S/PC	20.25 bc	4.52 bcde	21.87 e

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto), S/PC (Sin *Phytophthora capsici*), CH11 (Cepa de *Phytophthora capsici*). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas, Tukey ($p < 0.05$).

b) Variables microbiológicas a los 50 días después del trasplante

En las plantas de chile poblano inoculadas con HMA se encontró una alta colonización micorrízica de hasta 63%, a 50 días después del trasplante (Cuadro 12), lo cual evidencia que es una especie altamente micotrófica, pues Lucas-Santoyo (2011) reportó hasta 92.92% también en *C. annuum*. Todos los

tratamientos en los que se inoculó el consorcio CM fueron estadísticamente iguales. El número de esporas osciló entre 200 y 442 esporas en 100 g de sustrato seco (Cuadro 12), donde el tratamiento CM-02-S/PC fue estadísticamente superior a todos con una media de 442.4 esporas. En las plantas donde no se inoculó consorcio micorrízico, se encontró micelio en algunas raíces y un número muy bajo de esporas en el sustrato (alrededor de 10). Normalmente no se deberían encontrar estas estructuras de HMA en estos tratamientos sin embargo, es común que se registren estos datos debido a que este experimento es un sistema abierto en donde las unidades experimentales no están aisladas y podrían contaminarse al momento de realizar los riegos mediante salpicaduras de agua.

El registro de éstas variables permitió determinar el grado de micorrización de las plantas de chile poblano antes de la inoculación de los actinomicetos y el fitopatógeno. Los porcentajes de colonización micorrízica y número de esporas de HMA fueron similares a los encontrados para el mismo consorcio en el experimento de selección de HMA de ésta tesis (Figuras 44 y 46).

Cuadro 12. Variables microbiológicas evaluadas a los 50 días después del trasplante de chile poblano cultivar San Luis, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Colonización micorrízica (%)	Número de esporas en 100 g de sustrato seco
T1 CM-39-CH11	60.0 a	235.77 bc
T2 CM-39-S/PC	56.6 a	295.16 b
T3 CM-02-CH11	50.0 a	304.76 b
T4 CM-02-S/PC	60.0 a	442.44 a
T5 CM-(39-02)-CH11	50.0 a	233.33 bc
T6 CM-(39-02)-S/PC	46.6 a	201.23 c
T7 CM-S/ACT-CH11	53.3 a	237.50 bc
T8 CM-S/ACT-S/PC	60.0 a	259.25 bc
T9 S/HMA-39-CH11	2.3 b	9.52 d
T10 S/HMA-39-S/PC	3.3 b	8.73 d
T11 S/HMA-02-CH11	0.0 b	12.69 d

T12 S/HMA-02-S/PC	4.3 b	9.52 d
T13 S/HMA-(39-02)-CH11	0.0 b	11.11 d
T14 S/HMA-(39-02)-S/PC	3.3 b	9.52 d
T15 S/HMA-S/ACT-CH11	5.0 b	11.11 d
T16 S/HMA-S/ACT-S/PC	2.6 b	10.31 d

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto), S/PC (Sin *Phytophthora capsici*), CH11 (Cepa de *Phytophthora capsici*). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, Tukey (P<0.05).

c) Variables morfológicas.

- Plantas sin inoculación del fitopatógeno.

Ochenta y dos días después del trasplante se realizó un muestreo destructivo de todas las unidades experimentales. Los resultados de biomasa fresca y seca (hojas, tallo, raíz y fruto), área foliar y volumen radical registrados en plantas sin inoculación de *Phytophthora capsici* se presentan en los Cuadros 13 y 14. En el caso de las plantas donde se inoculó el fitopatógeno, los resultados se muestran en los Cuadros 15 y 16.

En las plantas donde no se inoculó el fitopatógeno (Cuadros 13 y 14), los resultados mostraron que las plantas micorrizadas presentaron los mayores valores en todas las variables evaluadas. Los tratamientos donde se inocularon HMA fueron estadísticamente iguales entre ellos sin embargo, los tratamientos donde se inoculó el consorcio micorrízico y el actinomiceto ABV39 (CM-39-S/PC) o el actinomiceto ABV02 (CM-02-2/PC) registraron los mayores valores en biomasa fresca y biomasa seca respectivamente y fueron estadísticamente superiores al control sin micorrización e inoculación de actinomicetos (S/HMA-S/ACT-S/PC). Esto demuestra que existe un efecto sinérgico entre la co-inoculación de HMA y actinomicetos en la promoción del crecimiento y biomasa en las plantas de chile poblano. El tratamiento S/HMA-(39-02)-S/PC fue estadísticamente igual a las plantas micorrizadas, por lo que la interacción entre ambos actinomicetos (ABV39 y ABV02) podría promover el crecimiento de forma similar a la micorrización en plantas de chile poblano cultivar San Luis.

Cuadro 13. Biomasa fresca (hojas, tallo, raíz y fruto), área foliar y volumen radical en plantas de chile poblano micorrizadas y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Biomasa fresca (g)					Área foliar (cm ²)	Volumen radical (mL)
	Hojas	Tallo	Raíz	Fruto	Total		
T2 CM-39-S/PC	4.42 a	4.91 a	6.59 a	2.51 a	18.44 a	107.9 a	5.12 a
T4 CM-02-S/PC	4.21 a	4.50 a	6.11 ab	3.33 a	18.16 a	104 ab	4.71 a
T6 CM-(39-02)-S/PC	3.82 ab	3.78 ab	5.94 ab	3.28 a	16.83 a	91.3 ab	3.5 ab
T8 CM-S/ACT-S/PC	4.05 ab	3.85 ab	6.54 a	2.87 a	16.97 a	106.2 a	4.5 a
T10 S/HMA-39-S/PC	2.53 cd	2.93 b	4.44 bc	3.00 a	12.49 ab	53.3 cd	3.0 ab
T12 S/HMA-02-S/PC	3.23 bc	3.18 b	6.20 ab	2.04 a	13.64 ab	75.7 bc	4.87 a
T14 S/HMA-(39-02)-S/PC	3.70 ab	3.78 ab	6.16 ab	3.42 a	16.64 a	82 abc	4.62 a
T16 S/HMA-S/ACT-S/PC	2.17 d	2.67 b	3.82 c	1.47 a	9.96 b	45.9 d	2.37 b

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomicetos 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto), S/PC (Sin *Phytophthora capsici*). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, Tukey (P<0.05).

Cuadro 14. Biomasa seca (hojas, tallo, raíz y fruto) en plantas de chile poblano micorrizadas y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Biomasa seca (g)				
	Hojas	Tallo	Raíz	Fruto	Total
T2 CM-39-S/PC	0.97 a	1.18 a	0.97 ab	1.04 a	4.17 a
T4 CM-02-S/PC	0.97 a	1.09 ab	0.85 abc	1.294 a	4.21 a
T6 CM-(39-02)-S/PC	0.77 ab	0.89 abc	0.75 bc	0.93 a	3.40 ab
T8 CM-S/ACT-S/PC	0.70 ab	0.82 abc	0.97 ab	0.69 a	3.20 ab
T10 S/HMA-39-S/PC	0.52 bc	0.69 bc	0.53 bc	1.30 a	3.06 ab
T12 S/HMA-02-S/PC	0.73 ab	0.74 bc	0.79 abc	0.37 a	2.63 b
T14 S/HMA-(39-02)-S/PC	0.79 ab	0.77 abc	0.75 bc	0.58 a	2.91 ab
T16 S/HMA-S/ACT-S/PC	0.30 c	0.51 c	0.45 c	0.25 a	1.51 b

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV02 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomicetos 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto), S/PC (Sin *Phytophthora capsici*). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

- Plantas con inoculación del fitopatógeno

Los resultados de las variables de biomasa fresca y seca (hojas, tallo, raíz y fruto), área foliar y volumen radical en plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* se muestran en los Cuadros 15 y 16. En general estos tratamientos presentaron valores más bajos en todas las variables evaluadas, en comparación a los encontrados en las plantas sin inoculación del fitopatógeno. Esto es debido a que todas las plantas inoculadas con *Phytophthora capsici* se enfermaron por marchitez lo que causó la pérdida de biomasa vegetal. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Los tratamientos CM-02-CH11 y CM-39-CH11 fueron estadísticamente superiores en todas las variables evaluadas al control sin micorrización y sin inoculación de actinomicetos (S/HMA-S/ACT-CH11) a excepción de la biomasa fresca radical. Los tratamientos CM-(39-02)-CH11 y CM-S/ACT-CH11 registraron resultados similares en biomasa seca a los tratamientos CM-39-CH11 y CM-02-CH11, y resultaron ser superiores estadísticamente al control. Con base en estos resultados, la micorrización por sí sola o la combinación entre el inóculo micorrízico CM y cualquiera de los dos actinomicetos (ABV02 y ABV39), permitió mantener mayor biomasa fresca y seca después de la inoculación del fitopatógeno.

El control S/HMA-S/ACT-CH11 y el tratamiento donde solamente se inoculó la combinación entre actinomicetos y el fitopatógeno (S/HMA-(39-02)-CH11), presentaron los menores valores en todas las variables evaluadas. Lo anterior podría indicar que la aplicación combinada de actinomicetos en ausencia de micorrización no evita la pérdida de biomasa seca por la marchitez causada por *Phytophthora capsici*.

Cuadro 15. Biomasa fresca (hojas, tallo, raíz y fruto), área foliar y volumen radical en plantas de chile poblano micorrizadas, infectadas con *Phytophthora capsici* y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Biomasa fresca (g)					Área foliar (cm ²)	Volumen radical (mL)
	Hojas	Tallo	Raíz	Fruto	Total		
T1 CM-39-CH11	2.09 ab	2.21 abc	1.06 b	1.00 ab	6.38 ab	59.8 a	0.72 ab
T3 CM-02-CH11	2.32 a	3.01 a	0.93 b	1.86 a	8.14 a	55.2 ab	0.67 ab
T5 CM-(39-02)-CH11	1.79 abc	2.40 ab	0.64 b	1.85 a	7.23 a	49.7 ab	0.27 b
T7 CM-S/ACT-CH11	2.17 ab	2.59 ab	0.90 b	1.21 ab	6.88 ab	50.8 ab	0.33 b
T9 S/HMA-39-CH11	1.29 bcd	1.40 c	2.56 b	0.47 b	5.45 abc	33.7 bc	0.9 ab

T11 S/HMA-02-CH11	1.79 abc	2.22 abc	2.69 a	0.53 b	7.21 a	49.6 ab	1.01 a
T13 S/HMA-(39-02)-CH11	0.90 cd	1.29 c	0.85 b	0.48 b	3.53 c	19.8 c	0.35 b
T15 S/HMA-S/ACT-CH11	0.59 d	1.73 bc	1.15 b	0.37 b	4.07 c	15.4 c	0.67 ab

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto, CH11 (Cepa CH11 de *Phytophthora capsici*). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, Tukey (P<0.05).

Cuadro 16. Biomasa seca (hojas, tallo, raíz y fruto) en plantas de chile poblano micorrizadas, infectadas con *Phytophthora capsici* y/o inoculadas con actinomicetos a 82 días después del trasplante, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Biomasa seca (g)				
	Hojas	Tallo	Raíz	Fruto	Total
T2 CM-39-CH11	0.59 a	0.62 ab	0.29 ab	0.44 ab	1.96 abc
T4 CM-02-CH11	0.56 a	0.78 a	0.31 a	0.88 a	2.53 a
T6 CM-(39-02)-CH11	0.54 ab	0.72 ab	0.27 ab	0.96 a	2.49 a
T8 CM-S/ACT-CH11	0.58 a	0.73 ab	0.25 ab	0.65 ab	2.23 ab
T10 S/HMA-39-CH11	0.34 abc	0.35 c	0.27 ab	0.09 b	1.06 cd
T12 S/HMA-02-CH11	0.54 ab	0.53 bc	0.31 a	0.14 b	1.54 bcd
T14 S/HMA-(39-02)-CH11	0.30 bc	0.38 c	0.11 c	0.13 b	0.93 d
T16 S/HMA-S/ACT-CH11	0.23 c	0.38 c	0.18 bc	0.04 b	0.85 d

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto,

CH11 (Cepa CH11 de *Phytophthora capsici*). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

- Severidad de la enfermedad

Ochenta y dos días después del trasplante (20 días después de la inoculación de *Phytophthora capsici*) todas las plantas de chile poblano mostraron síntomas de marchitez (Figura 55). Sin embargo, al comparar el nivel de severidad de las plantas con la escala de virulencia, se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Donde los tratamientos **CM-02-CH11** y **CM-39-CH11** presentaron un nivel de severidad de la enfermedad menor (dos, de acuerdo con la escala de virulencia) (Figura 54). Esto se relaciona con los resultados encontrados para las variables de biomasa fresca, seca y área foliar donde la aplicación de estos tratamientos evitó la pérdida de biomasa en presencia del fitopatógeno. En el control negativo donde únicamente se inoculó a *Phytophthora capsici*, las plantas murieron a causa la enfermedad.

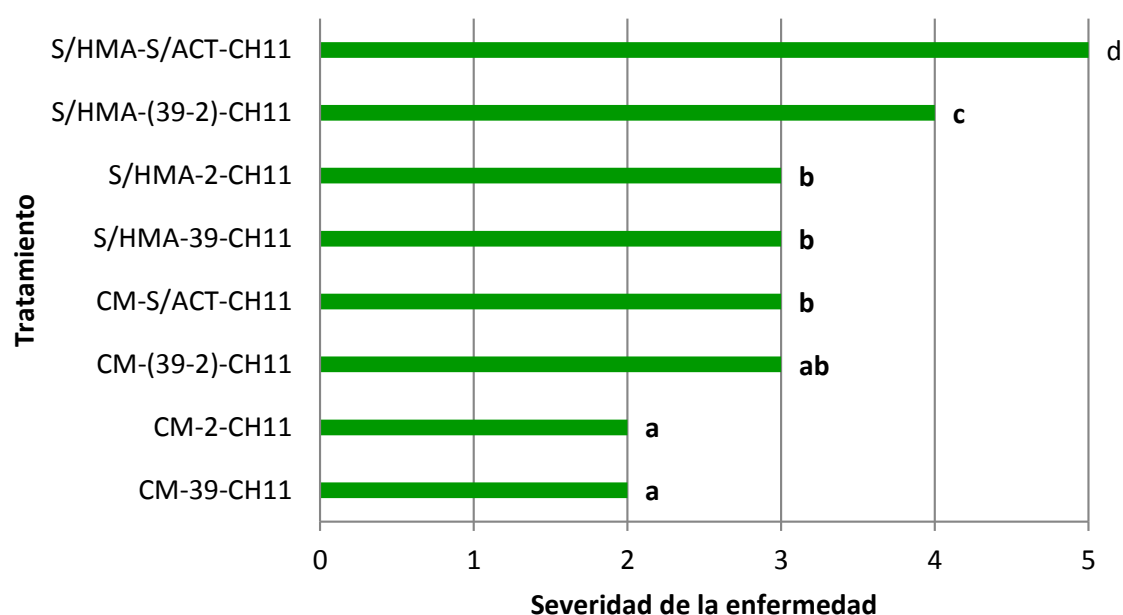


Figura 54. Severidad de la marchitez en plantas de chile poblano cultivar San Luis de acuerdo a la micorrización y/o inoculación de actinomicetos. Letras diferentes en barras indican diferencias estadísticas significativas, Dunn ($p < 0.05$). CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02 combinados), S/ACT (Sin actinomiceto), CH11 (Cepa CH11 de *Phytophthora capsici*).



Figura 55. Severidad de la marchitez en plantas de chile poblano a los 82 días después del trasplante (20 días después de la inoculación de *Phytophthora capsici*). Tratamientos: a) CM-39-CH11, b) CM-02-CH11, c) CM-(30-02)-CH11, d) CM-S/ACT-S/PC, e) S/HMA-39-CH11, f) S/HMA-02-CH11, g) S/HMA-(39-02)-S/PC y h) S/HMA-S/ACT-CH11. CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), AVB2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto, CH11 (Cepa de *Phytophthora capsici*)).

En base a los resultados observados, la micorrización con el inóculo CM y los actinomicetos ABV02 o ABV39 disminuyó en tres niveles la severidad de la marchitez en plantas de chile poblano cultivar San Luis en comparación con la ausencia de inoculación de microorganismos antagonistas. Por otro lado, en el tratamiento donde se inoculó la combinación entre actinomicetos más el fitopatógeno (S/HMA-(39-02)-CH11), las plantas presentaron un nivel de severidad de cuatro (4), lo que indicó que la inoculación conjunta de estos actinomicetos no tiene efecto bioprotector contra la marchitez. Esto podría indicar una posible inhibición entre ellos en condiciones *in planta*, sin embargo esto es contrario a lo observado bajo condiciones *in vitro* en el capítulo dos de esta tesis, por lo cual es necesario el desarrollo de nuevos experimentos para corroborar esta hipótesis.

Los resultados de los tratamientos donde hubo una co-inoculación, permiten establecer una posible relación sinérgica entre HMA y actinomicetos frente a *Phytophthora capsici*. En ésta relación sinérgica entre ambos microorganismos benéficos, los HMA podrían estar generando un ambiente propicio para el establecimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y actinomicetos al estar asociados al micelio extrarradical dentro de la micorrizósfera, lo que a su vez impediría el ataque de fitopatógenos hacia la raíz. Entonces, la capacidad de los HMA para controlar enfermedades del suelo estaría fuertemente relacionada con su capacidad para favorecer el establecimiento de rizobacterias antagonistas a fitopatógenos (Lioussanne, 2010), como es el caso particular de los actinomicetos donde el género *Streptomyces* incluso es considerado una bacteria ayudante de la micorrización (Mycorrhiza helper bacteria, MHB) (Alves-Rigamonte *et al.*, 2010).

La posible bioprotección por una mejora nutricional resultante de la micorrización (registrada como incremento en biomasa), concuerda con lo reportado por Gómez-Dorantes y colaboradores (2008), donde en plantas de jitomate (*Lycopersicum esculentum*) premicorrizadas se redujo la susceptibilidad a *Phytophthora capsici*. Este efecto, lo atribuyeron a la mejora nutricional y a la competencia por compuestos de carbono entre los microorganismos.

Sin embargo, también podrían interferir mecanismos de acción indirecta como la inducción de resistencia sistémica en la planta. En éste sentido Ozgonen y Erkilic (2007), mencionaron que la inducción de resistencia sistémica (evidenciada principalmente por el incremento de las concentraciones de ácido jasmónico, etileno y fitoalexinas como el capsidiol) podría explicar que las plantas de chile micorrizadas presentaran menor daño por la enfermedad que plantas no micorrizadas. A pesar de que no se determinaron en ésta tesis, otros mecanismos indirectos que podrían estar implicados en la reducción de la severidad por efecto de la micorrización como: modificaciones en la arquitectura radical y el mantenimiento del equilibrio redox en respuesta al estrés biótico (Azcón-Aguilar y Barea, 1996), también podrían estarse presentando.

En el caso particular de los actinomicetos, en la literatura se reportan algunos estudios sobre bioprotección contra *Phytophthora capsici*. Ezziyyani y colaboradores (2006) demostraron que *Streptomyces rochei* logró inhibir el crecimiento de *Phytophthora capsici* en combinación con *Trichoderma harzianum* en condiciones *in vitro*. Además de ser los primeros en elaborar una formulación compuesta por éstos dos microorganismos benéficos para el control de la pudrición de raíz en plantas de chile, en este mismo estudio se logró purificar a partir de *Streptomyces* un compuesto (1 propanol, 1-4 clorofenil) con capacidad antagonica contra este fitopatógeno.

Existen pocos estudios sobre la aplicación de actinomicetos en el biocontrol de enfermedades en condiciones *in planta*, sin embargo recientemente Goudjal *et al.*, (2014) encontraron que la aplicación de un consorcio de seis actinomicetos como recubrimiento en las semillas de tomate, redujo hasta un 86.6% la incidencia de la enfermedad conocida como damping-off (causada por el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*) en almácigos con sustrato infestado. Además se incrementó significativamente la biomasa y la longitud de la raíz de las plántulas. En otro estudio Xuan-Hoa y colaboradores (2012) al evaluar un extracto elaborado a base de *Streptomyces griseus* (cepa H7602) contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile en maceta bajo invernadero, encontraron que el extracto redujo hasta 47.35% la mortalidad de

la raíz e incrementó 56.37% la biomasa fresca radical lo que se vio reflejado como un efecto bioprotector del actinomiceto contra el oomycete. El mecanismo de acción del actinomiceto contra el fitopatógeno, lo atribuyeron principalmente a la actividad enzimática (quitinasa y β -1,3 glucanasa) de ésta cepa, debido a que ésta actividad fue mayor en el sustrato que fue tratado con el actinomiceto. Estos reportes indican un claro efecto bioprotector y promotor del crecimiento por actinomicetos lo que es similar a lo encontrado en el presente trabajo.

d) Variables microbiológicas al final del experimento.

Ochenta y dos días después del trasplante se registró nuevamente el porcentaje de colonización micorrízica y el número de esporas de HMA en el sustrato. Además se determinó el porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora capsici* y las unidades formadoras de colonias (UFC) de actinomicetos (Cuadro 17).

Cuadro 17. Variables microbiológicas evaluadas al final del experimento (82 días después del trasplante) de plantas de chile cultivar San Luis, bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Colonización micorrízica (%)	Esporas en 100 g de suelo seco	Infección de <i>P. capsici</i> en la raíz (%)	UFC actinomicetos (10^4)
T1 CM-39-CH11	60.0 a	190.00 abc	12.66 a	1.0 a
T2 CM-39-S/PC	51.11 a	257.77 a	0	1.6 a
T3 CM-02-CH11	58.88 a	187.77 abc	18.33 ab	1.6 a
T4 CM-02-S/PC	46.66 a	243.33 a	0	2.0 a
T5 CM-(39-02)-CH11	62.22 a	167.78 bc	26.66 abc	2.6 a
T6 CM-(39-02)-S/PC	51.11 a	136.66 c	0	1.3 a
T7 CM-S/ACT-CH11	66.66 a	217.77 ab	33.33 abc	0.0 b
T8 CM-S/ACT-S/PC	52.22 a	125.55 c	0	0.0 b
T9 S/HMA-39-CH11	3.33 b	2.22 d	45.0 bcd	1.3 a
T10 S/HMA-39-S/PC	5.55 b	5.55 d	0	0.6 a
T11 S/HMA-02-CH11	1.11 b	3.33 d	48.33 cd	0.3 a
T12 S/HMA-02-S/PC	3.33 b	4.44 d	0	1.3 a

T13 S/HMA-(39-02)-CH11	1.111 b	7.777 d	51.666 cd	2.3 a
T14 S/HMA-(39-02)-S/PC	3.333 b	3.333 d	0	0.6 a
T15 S/HMA-S/ACT-CH11	3.333 b	4.444 d	70.0 d	0.0 b
T16 S/HMA-S/ACT-S/PC	2.222 b	1.111 d	0	0.0 b

CM (Cerro del Metate), S/HMA (Sin HMA), AVB39 (Actinomiceto 39), ABV2 (Actinomiceto 02), ABV39-ABV02 (Actinomiceto 39 y 02), S/ACT (Sin actinomiceto), S/PC (Sin *Phytophthora capsici*), CH11 (Cepa CH11 de *Phytophthora capsici*), UFC (Unidades formadoras de colonias). Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas, Tukey ($P < 0.05$).

En las plantas inoculadas con HMA, se registraron altos porcentajes de colonización micorrízica (66%), estos resultados son muy similares a los reportados a los 50 DDT (Cuadro 12), por lo que no se observó un incremento en el nivel de micorrización de las plantas inoculadas con HMA. Se observaron estructuras en la raíz principalmente micelio intrarradical, extrarradical, vesículas y esporas (Figura 57). Respecto al número de esporas en el sustrato, estas disminuyeron con respecto a lo reportado a los 50DDT, el tratamiento donde se inoculó el consorcio CM y el actinomiceto ABV02 en ausencia de *Phytophthora capsici* registró el mayor valor de densidad de esporas con un promedio de 255.77 esporas en 100 g de sustrato seco. Sin embargo la densidad de esporas fue inferior a lo reportado a los 50 DDT (442.4 esporas en 100 g de sustrato). Es posible que la inoculación de los actinomicetos y *Phytophthora capsici* haya provocado una reducción en el número de esporas de HMA debido a competencia por espacio al haber una mayor cantidad de esporas de otros microorganismos.

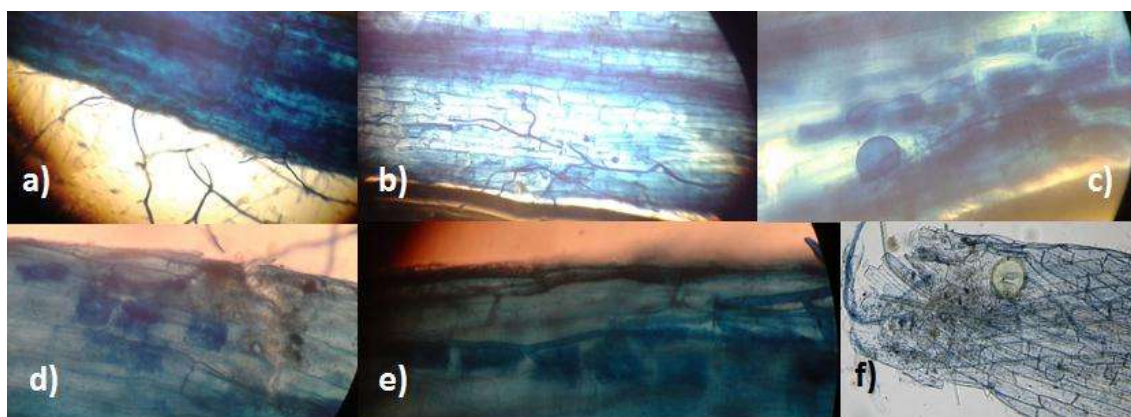


Figura 56. Estructuras micorrízicas observadas en plantas de chile poblano a los 82 DDT, a) micelio extrarradical, b) micelio intrarradical, c) micelio y vesículas, d) y e) micelio y arbúsculos, f) esporas.

El porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora capsici* (Figura 58) mostró diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre los tratamientos donde se inoculó al fitopatógeno (Cuadro 17). Se encontraron menores porcentajes de infección de raíces por *Phytophthora capsici* en los tratamientos donde se inoculó HMA, siendo los tratamientos CM-39-CH11 y CM-02-CH11, donde se presentó una menor infección del fitopatógeno. Esto sugiere un efecto antagónico por competencia por sitios de infección (Azcón-Aguilar y Barea, 1996) entre HMA y *Phytophthora capsici*. Este efecto se corroboró al encontrar una correlación negativa significativa ($p < 0.05$) al comparar el porcentaje de colonización micorrízica con las variables de: porcentaje de infección de raíces de *Phytophthora* ($r = -0.7304$) y el nivel de severidad de la enfermedad ($r = -0.506$), (Cuadro 18).

Respecto a las UFC de actinomicetos en el sustrato no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos donde se inocularon estos microorganismos. Donde se registraron concentraciones entre 0.33 y 2.66×10^4 UFC por gramo de sustrato. No se encontraron UFC en los tratamientos donde no se aplicaron actinomicetos.

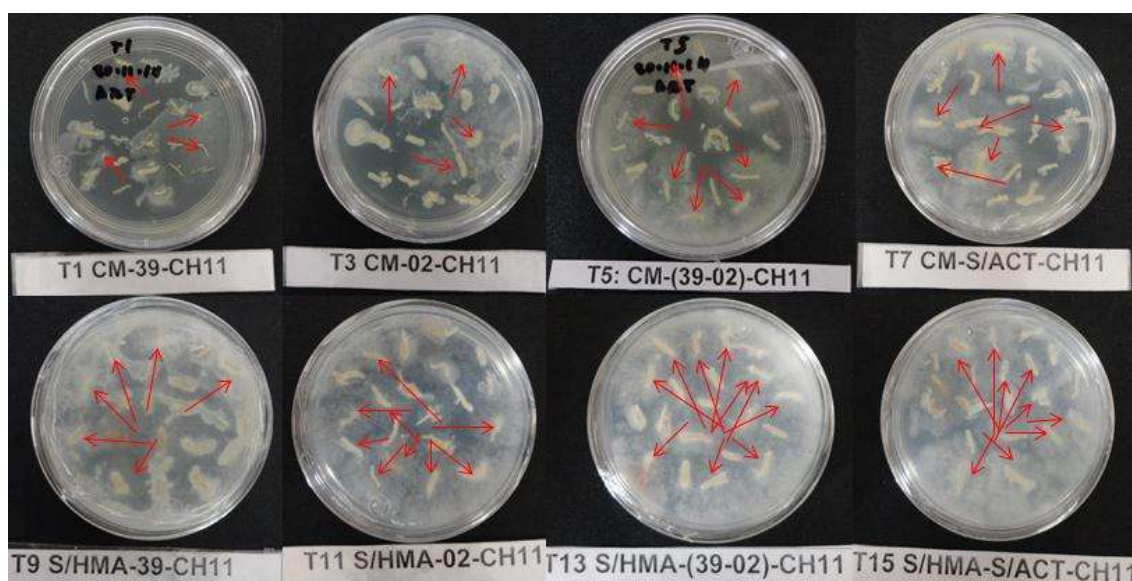


Figura 57. Infección de raíces por *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano a los 82 DDT. Las flechas en color rojo indican raíces donde creció el fitopatógeno y representan raíces infectadas.

e) Análisis de interacción entre factores de estudio

- Biomasa seca Total

En la figura 59, se observa que no hay interacción entre los factores actinomiceto y HMA en la respuesta a la biomasa seca de plantas de chile poblano a 82 días después del trasplante ($p = 0.65$). Se observa que la aplicación de HMA y actinomicetos incrementó la biomasa, lo que demuestra un efecto promotor del crecimiento. Sin embargo, el efecto es mayor cuando se inocula únicamente con HMA. Éste análisis demostró que la promoción del crecimiento vegetal expresada en biomasa seca se debe únicamente a la inoculación del consorcio micorrízico CM, por lo que los actinomicetos no promovieron un incremento en biomasa.

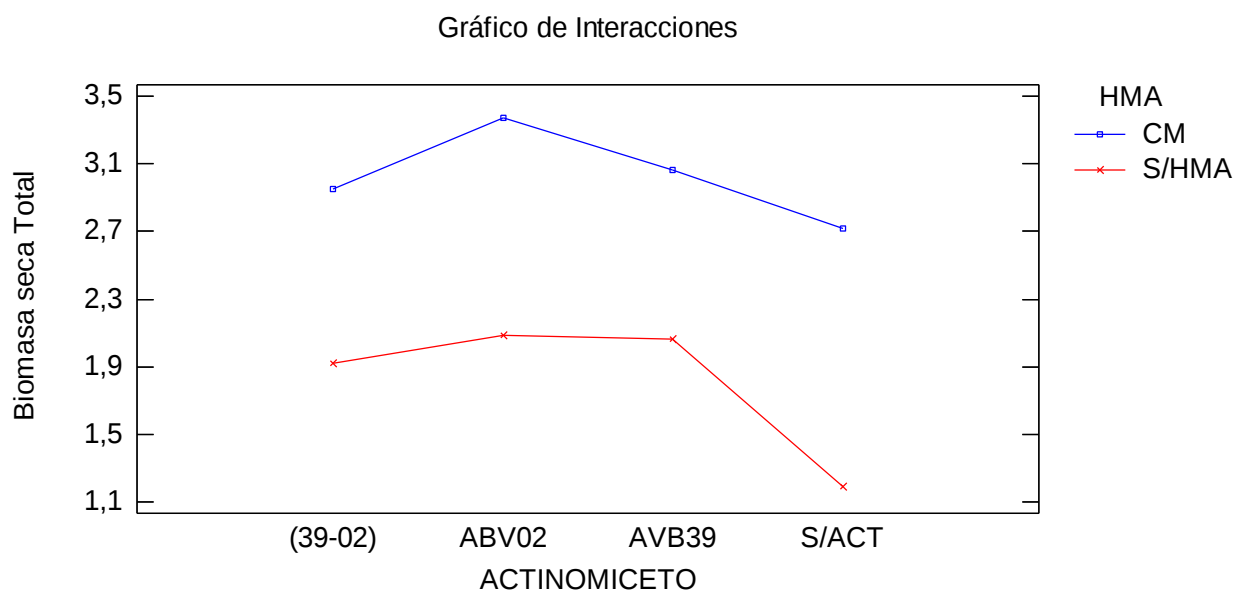


Figura 58. Interacciones entre los factores actinomiceto y HMA sobre la biomasa seca total en plantas de chile poblano a los 82 DDT.

- Severidad de la enfermedad

Se encontró una interacción estadísticamente significativa ($p = 0.034$) entre los factores actinomiceto y HMA sobre la severidad de la marchitez en las plantas de chile poblano, como se puede ver en la Figura 60. Se observa que ambos factores disminuyeron significativamente la severidad de la enfermedad. Sin embargo, fueron más efectivos los HMA que los actinomicetos. Respecto al efecto bioprotector de los actinomicetos, resultó ser más efectiva la aplicación de manera individual que combinada. De forma separada redujo la enfermedad hasta un nivel tres de acuerdo a la escala de virulencia. La interacción entre HMA y actinomiceto reflejó una interacción sinérgica al reducir la severidad de la enfermedad al presentar las plantas un nivel entre dos y tres. Las plantas sin co-inoculación no sobrevivieron. Esto demuestra que la co-inoculación de HMA y actinomicetos es capaz de proteger a las plantas de chile poblano al reducir significativamente ($p = 0.034$) la marchitez causada por *Phytophthora capsici*.

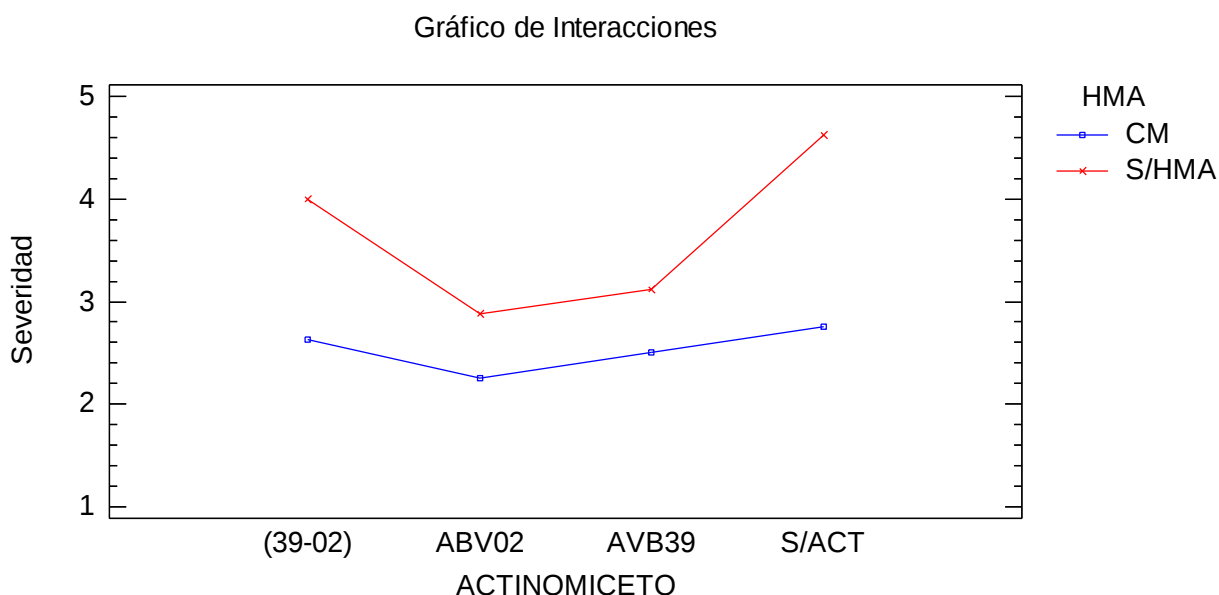


Figura 59. Interacciones entre los factores actinomiceto y HMA sobre la severidad de la marchitez en plantas de chile poblano a los 82 DDT.

f) Análisis de Correlaciones

Se realizó un análisis de correlaciones de Pearson (r) entre las diferentes variables evaluadas (Cuadro 18). Con el objetivo de definir la relación entre las variables microbiológicas de: colonización micorrízica, número de esporas de HMA e infección de raíces por *Phytophthora capsici*, con las variables de crecimiento más representativas (biomasa fresca y seca total) y con la variable del nivel de severidad de la enfermedad.

Se encontró una correlación positiva significativa ($p < 0.05$) entre el porcentaje de colonización micorrízica y la biomasa fresca total ($r = 0.4355$) y biomasa seca total ($r = 0.6204$), al igual que el número de esporas de HMA ($r = 0.4961$ y $r = 0.7064$) respectivamente a los 82 días después del trasplante. Esto refuerza y confirma la hipótesis de que la micorrización promueve un mayor crecimiento en plantas de chile poblano reflejado en una mayor biomasa seca. Con respecto a las UFC de colonias de actinomicetos, éstas no mostraron ninguna correlación significativa ($p > 0.05$) con ninguna de las variables evaluadas.

Por otro lado el porcentaje de colonización micorrízica presentó correlaciones negativas significativas ($p < 0.05$) con el porcentaje de infección de *Phytophthora capsici* en la raíz ($r = -0.7304$) y la severidad de la marchitez ($r = -0.506$), lo mismo para el número de esporas de HMA ($r = -0.7790$ y $r = -0.5775$) respectivamente, lo que indica que entre mayor fue la colonización micorrízica la infección de raíces por *Phytophthora capsici* fue menor. Con base en lo anterior, es evidente que el consorcio micorrízico CM que presentó porcentajes de colonización de hasta 66% muestre un comportamiento antagónico contra *Phytophthora capsici*. Pues al micorrizar en mayor porcentaje la raíz impidió una mayor infección de raíces por el fitopatógeno que a su vez se vio reflejado en una disminución de la severidad de la enfermedad. Esto sugirió que uno de los posibles mecanismos de bioprotección por los HMA, es la competencia por espacio y nutrientes dentro de la micorrizósfera y puntos de infección en la raíz de la planta (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Las UFC de actinomicetos mostraron una correlación negativa (-0.1123) con la severidad de la marchitez, sin embargo no fue significativa, pero pudiera explicar el efecto aparentemente sinérgico mostrado con la micorrización y/o la inoculación de cualquiera de las dos cepas (ABV02 y ABV39).

Cuadro 18. Coeficiente de correlaciones de Pearson entre las variables de crecimiento, morfológicas y microbiológicas evaluadas en el experimento de chile poblano cultivar San Luis bajo condiciones de invernadero.

	% Colonización micorrízica	% Infección de <i>P. capsici</i>	Altura de planta	Área foliar	Biomasa fresca total	Biomasa seca total	Diámetro del tallo	Número de esporas de HMA	Número de hojas	Severidad de la marchitez	UFC Actinomicetos	Volumen radical
% Colonización micorrízica		-0.73*	0.44*	0.46*	0.43*	0.62*	0.61*	0.96*	0.66*	-0.50*	0.11	0.00
% Infección de <i>P. capsici</i>	-0.73*		-0.30	-0.50*	-0.46*	-0.65*	-0.55*	-0.77*	0.63*	0.64*	0.09	-0.03
Altura de planta	0.44*	-0.30		0.08	0.09	0.36	0.65*	0.44*	0.56*	-0.16	0.34	0.09
Área foliar	0.46*	-0.50*	0.08		0.57*	0.52*	0.25	0.46*	0.45*	-0.76*	-0.06	0.16
Biomasa fresca total	0.43*	-0.46*	0.09	0.57*		0.78*	0.18	0.49*	0.05	-0.75*	-0.02	0.38
Biomasa seca total	0.62*	-0.65*	0.36	0.52*	0.78*		0.45*	0.70*	0.32	-0.66*	0.07	0.24
Diámetro del tallo	0.61*	-0.55*	0.65*	0.25	0.18	0.45*		0.60*	0.59*	-0.31	0.21	0.08
Número de esporas de HMA	0.96*	-0.77*	0.44*	0.46*	0.49*	0.70*	0.60*		0.62*	-0.57*	0.07	0.02
Número de hojas	0.66*	-0.63*	0.56*	0.45*	0.05	0.32	0.59*	0.62*		-0.46*	0.19	-0.01
Severidad de la marchitez	-0.5*	0.64*	-0.16	-0.76*	-0.75*	-0.66*	-0.31	-0.57*	-0.46*		-0.11	-0.29
UFC Actinomicetos	0.11	0.09	0.34	-0.06	-0.02	0.07	0.21	0.07	0.19	-0.11		-0.09
Volumen radical	0.00	-0.03	0.09	0.16	0.38	0.24	0.08	0.02	-0.01	-0.29	-0.09	

HMA, Hongos Micorrízicos Arbusculares; UFC, Unidades Formadoras de Colonias). * Indica correlaciones estadísticamente significativas

4.8 CONCLUSIONES

Los resultados de éste experimento mostraron que la micorrización en plantas de chile poblano cultivar San Luis favoreció el crecimiento vegetal, al registrarse valores mayores en altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas, en comparación con la ausencia de micorrización a 70 días después del trasplante. La micorrización también favoreció el incremento en biomasa fresca y seca a 84 días después del trasplante en ausencia de la inoculación con *Phytophthora capsici*. Por otro lado, en plantas inoculadas con el fitopatógeno, la micorrización y la inoculación conjunta de cualquiera de las dos cepas de actinomicetos redujo la severidad de la marchitez en comparación con plantas donde no se inocularon microorganismos antagonistas. La aplicación combinada de ambos actinomicetos en ausencia de micorrización no redujo la severidad de la enfermedad. Es posible que uno de los principales mecanismos de bioprotección por parte del consorcio CM contra la marchitez se deba a la competencia por espacio en la micorrizósfera y en la raíz, al encontrarse correlaciones negativas significativas con el porcentaje de infección de raíces por *Phytophthora capsici* y la severidad de la marchitez.

4.9 LITERATURA CITADA

- Alonso-Contreras R., L. I. Aguilera-Gómez, M. Rubí-Arriaga, A. González-Huerta, V. Olalde-Potugal y I. V. Rivas-Manzano. 2013. Influencia de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y desarrollo de *Capsicum annuum* L. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4: 77-88.
- Alves-Rigamonte T., V. Satler-Pylro and G. Frois-Duarte. 2010. The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations. Brazilian Journal of Microbiology 41: 832-840.
- Azcón-Aguilar C. and J. M. Barea. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6: 457- 464.

- Ezziyyani M., M. E. Requena, G. Egea-Gilabert and M. E. Candela. 2006. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. Journal of Phytopathology 155: 342-349.
- Franco-Correa M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR de actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral, Universidad de Granada 261 p.
- Franco-Correa M., A. Quintana, C. Duque, C. Suárez, M. X. Rodríguez and J. M. Barea. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. Applied Soil Ecology 45: 209-217.
- Gerdemann J. W. and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society 46: 235-244.
- Gómez-Dorantes, N., Y. Carreón-Abud y S. P. Fernández-Pavía. 2008. Reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici* Leonian causante de la pudrición de raíz en jitomate (*Solanum lycopersicum* L). Biológicas 10:100-108.
- Gómez-Vargas R. M., D. C. Bello-Bello, L. D. Prada-Salcedo, M. X. Rodríguez-Bocanegra, L. D. Gómez-Méndez y M. Franco-Correa. 2011. Actinomicetos mineralizadores de fosfato involucrados en la interacción radical de *Glomus sp.*-trébol blanco. Agronomía Mesoamericana 22 (2): 317-327.
- Goudjal Y., O. Toumatia, A. Yekkour, N. Sabaou, F. Mathieu and A. Zitouni. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. Microbiological Research 169: 59-65

- Haneef K, M., M. K. Meghvansi, V. Panwar, H. K. Gogoi and L. Singh. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi-induced signalling in plant defence against phytopathogens. *Journal of Phytology* 2: 53-69.
- Lioussanne L. 2010. Review. The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: 51-61.
- McGonigle T. P., M. H. Miller, D. G. Evans, G. L. Fairchild and A. Swan. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytology* 115: 495-501
- Medina-Cuevas H. L. y Z. Evangelista-Martínez. 2011. Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. *Tecnociencia* 5: 72-78.
- Ozgonen H. and A. Erkilic 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. *Crop Protection* 26: 1682-1688.
- Phillips, J.M. and D.S. Hayman 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-160.
- Ristaino J. B. 1990. Intraespecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. *Phytopathology* 80: 1253-1259.
- Walker C. 1997. Spore Extraction by Centrifugation-Sugar Flotation. Internal Document, Biological Research and Imaging Laboratory. New Milton, Hampshire, UK.
- Xuan-Joa N., N. Kiaw-Wai, L. Young-Seong, T. Hamisi, L. Geon-Hyoung, J. Byoung-Kon, R. Hee-Myeong, K. Sang-Jun, J. Woo-Jin and K Kil-Young.

2012. Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. Plant Pathology 28: 282-289.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Los actinomicetos son un grupo de bacterias del suelo con amplio potencial para ser utilizados como agentes de control biológico de enfermedades de plantas (Franco-Correa, 2008). La búsqueda de nuevas cepas con actividad antimicrobiana contra agentes fitopatógenos, ha tomado un mayor interés principalmente por la gran diversidad de antibióticos, compuestos bioactivos y enzimas extracelulares que inhiben el crecimiento y desarrollo de muchos agentes fitopatógenos de importancia económica (Medina Cuevas y Evangelista-Martínez, 2011), entre ellos *Phytophthora capsici* agente causal de la marchitez del chile (Xuan-Hoa et al., 2012). Los resultados mostrados en el primer capítulo de éste trabajo, permitieron comprobar la hipótesis de que diferentes cepas de actinomicetos aislados de suelo rizosférico tienen capacidad para inhibir el crecimiento de *Phytophthora capsici* en condiciones *in vitro*. Las doce cepas de actinomicetos evaluadas presentaron actividad antimicrobiana contra el fitopatógeno en confrontación dual, destacando la cepa ABV39 que inhibió el crecimiento de *Phytophthora capsici* en un porcentaje del 86%, seguido de las cepas ABV45 y ABV38 las cuales inhibieron un 73 y 69% respectivamente. Resultados similares se han reportado anteriormente en la literatura bajo condiciones *in vitro*. *Streptomyces rochei* inhibió el crecimiento radial de *Phytophthora capsici* en 81% tan sólo en cuatro días y en siete días fue capaz de parasitarlo (Ezziyyani et al., 2004). Recientemente Evangelista-Martínez (2014) reportó que, la cepa CA-CIS-1.16CA de *Streptomyces sp.* inhibió en promedio 61.5% a *Phytophthora capsici* en condiciones *in vitro*.

Con base en lo anterior los actinomicetos son potencialmente aplicables como agentes de control biológico de enfermedades de plantas y debido a que poseen diferentes mecanismos de acción (antibiosis, parasitismo, competencia) es posible que la aplicación combinada con otras cepas de actinomicetos o HMA presenten un efecto sinérgico sobre los fitopatógenos (González-Franco y Robles-Hernández, 2009). Sin embargo, para realizar una aplicación

combinada de actinomicetos es necesario realizar ensayos de confrontación *in vitro* y determinar su compatibilidad o antagonismo. En este sentido los resultados del capítulo dos de esta tesis mostraron que la gran mayoría de las combinaciones de cepas de actinomicetos presentaron antibiosis entre ellos. Sin embargo, 12 de ellas no presentaron inhibición, por lo que es posible su aplicación combinada en formulaciones *in planta*. Por el momento, no se tiene registro de este tipo de evaluaciones entre actinomicetos, la gran mayoría de las referencias indican el análisis de la compatibilidad entre HMA y hongos micoparásitos de fitopatógenos como *Trichoderma sp.* (De Jaeger *et al.*, 2011).

Por otro lado se sabe que los HMA son simbioses obligados de plantas, ésta asociación proporciona ciertas ventajas para ambos, en las plantas son reflejadas principalmente en una mayor promoción del crecimiento vegetal (Smith y Read, 1997). Además de ser capaces de antagonizar contra fitopatógenos mediante diferentes mecanismos de acción directos e indirectos como: mejora en el estatus nutricional, competencia por espacio y nutrientes en la micorrizósfera, competencia por puntos de infección en la raíz, modificaciones de la arquitectura radical y activación de respuestas de defensa en la planta (Azcón-Aguilar y Barea, 1996). Los resultados del capítulo tres de este trabajo mostraron que, un consorcio micorrízico (Cerro del Metate), fue capaz de promover el crecimiento y reducir la severidad de la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* en plantas de chile serrano y poblano bajo condiciones de invernadero. Estos resultados son relevantes y se confirman con la literatura, donde se han reportado resultados similares utilizando diferentes inóculos micorrízicos contra la marchitez (Espinosa-Victoria *et al.*, 2004; Ozgonen y Erkilic, 2007; Gómez-Dorantes *et al.*, 2008). Sin embargo resta la identificación de las especies contenidas en este consorcio para determinar los HMA que posiblemente favorezcan este efecto.

Los resultados de esta tesis indicaron un efecto antagónico por parte de los HMA y actinomicetos evaluados de forma individual contra *Phytophthora capsici*. Sin embargo, fue necesaria la evaluación de la co-inoculación de

ambos microorganismos *in planta*, donde se encontró un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento vegetal reflejado en las variables altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, biomasa fresca y seca total y área foliar. Las plantas micorrizadas e inoculadas con actinomicetos registraron los valores más altos y fueron estadísticamente superiores a los controles. El efecto sinérgico también se vio reflejado en la disminución de la severidad de la marchitez al ser comparada la sintomatología de las plantas de chile poblano con una escala de virulencia previamente establecida. En los tratamientos donde se aplicó el consorcio micorrízico (CM) y alguna de las dos cepas de actinomicetos (ABV39 y ABV02) se observó un menor daño de la enfermedad. Los resultados mostrados permitieron comprobar la hipótesis de que, la micorrización con HMA y actinomicetos es capaz de controlar la marchitez en plantas de chile. Son pocos los trabajos sobre la aplicación de actinomicetos contra *Phytophthora capsici in planta* (Goudjal *et al.*, 2014) y por otro lado no existen reportes de la inoculación conjunta de ambos microorganismos *in planta* contra *Phytophthora capsici*. Por lo que, los resultados presentados en este trabajo son relevantes y prometedores en la búsqueda de su aplicación biotecnológica en el manejo sustentable de la marchitez del cultivo de chile.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

Se encontró actividad antimicrobiana en doce cepas de actinomicetos al ser evaluadas frente a *Phytophthora capsici* en dos ensayos de antagonismo *in vitro*. Por otro lado, a partir de siete consorcios micorrízicos evaluados, el que provenía de Cerro del Metate disminuyó significativamente la severidad de la marchitez en plantas de chile serrano y poblano, además de promover su crecimiento. Finalmente la coinoculación de ambos microorganismos en plantas de chile poblano mostró un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento vegetal, y disminución de la severidad de la enfermedad. Ambos microorganismos podrían ser utilizados como una estrategia de control biológico de la marchitez en programas de manejo integrado de ésta enfermedad.

X. PERSPECTIVAS

Ante los resultados encontrados en este trabajo, es necesaria la evaluación de la inoculación tanto de actinomicetos como HMA en condiciones de campo donde la interacción de múltiples factores bióticos y abióticos afecta el biocontrol de ésta enfermedad. Por lo que, el desarrollo de una estrategia para el control de la marchitez del chile requiere del manejo integrado de cada factor como lo son: humedad (riegos) precipitaciones, temperatura, etc.

La aplicación de ambos microorganismos en el control biológico de la marchitez del chile constituye una herramienta importante en el desarrollo de nuevas estrategias de manejo dentro de la agricultura sustentable, pero hace falta evaluar más cepas o combinaciones de especies de microorganismos benéficos. Esto debido a que el efecto antagónico está en función de las cepas de microorganismos tanto benéficos como fitopatógenos, las condiciones de manejo y las especies vegetales donde son evaluados.

Asimismo, se sugiere la evaluación de las cepas de actinomicetos restantes y las combinaciones entre ellos, en condiciones *in planta*. Además es necesaria la identificación de las especies de HMA contenidas en el consorcio micorrízico Cerro del Metate.

XI. LITERATURA CITADA COMPLEMENTARIA

- Azcón-Aguilar C. and J. M. Barea. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457- 464.
- Bautista-Calles J., R. García-Espinosa, E. Zavaleta-Mejía, J. Pérez-Moreno, R. Montes-Belmont, R. Ferrera-Cerrato y M. Huerta-Lara. 2010. Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora capsici* Leo) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación del chile (*Capsicum annuum* L.). *Interciencia* 35: 613-618.
- De Jaeger N., I. E. De la Providencia, H. Rouhier and S. Declerck. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp. within alginate beads: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. *Journal of Applied Microbiology* 111: 125-135.
- Espinosa-Victoria D., D. González-Mendoza, J. Placencia-de la Parra, y R. García- Espinosa. 2004. Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo en el sistema radical de plántulas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intrarradices*. *Terra Latinoamericana* 22: 317-326.
- Ezziyyani M., C. Pérez-Sánchez, M. A. Requena, L. Rubio y M. E. Candela. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.
- Fiorilli V., M. Catoni, D. Francia, F. Cardinale and L. Lanfaranco. 2011. The arbuscular mycorrhizal symbiosis reduces disease severity in tomato plants infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 93: 237-242.
- Franco-Correa M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR de actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis doctoral, Universidad de Granada 261 p.

- Franco-Correa M. 2009. Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología* 16: 239-242.
- Gómez-Dorantes N., Y. Carreón-Abud, y S. P. Fernández-Pavia. 2008. Reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici* Leonian causante de la pudrición de raíz en jitomate (*Solanum lycopersicum* L). *Biológicas* 10:100-108.
- Gómez-Perazoli A., A. Pfeifer, y J. Sandberg. 2000. Plaguicidas químicos de uso agrícola registrados en Uruguay y prohibidos, retirados, severamente restringidos o no aprobados por gobiernos. Documentos CEUTA. <http://www.ceuta.org.uy>. (Consultada el 19 Octubre de 2012).
- González-Franco A. C. y L. Robles-Hernández. 2009. Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Tecnociencia Chihuahua* 3: 64-73.
- Goudjal Y., O. Toumatia, A. Yekkour, N. Sabaou, F. Mathieu and A. Zitouni. 2014. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research* 169: 59-65
- Herrera-Medina M. J., M. I. Tamayo, H. Vierheilig, J. A. Ocampo, and J. M. García-Garrido. 2008. The jasmonic acid signalling pathway restricts the development of the arbuscular mycorrhizal association in tomato. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 221-230.
- Jung-Sabine C., A. Martínez-Medina, J. A. López-Raez, and M. J. Pozo. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 38: 651-667 pp.
- León-Piña E. G. 2008. Biocontrol del patógeno *Phytophthora capsici*, por la interacción de Hongos Micorrízicos Arbusculares y *Azospirillum* en plantas de chile. Tesis de maestría. UMSNH. Morelia, Michoacán. 99 pp.

- Lioussanne L. 2010. Review. The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. Spanish Journal of Agricultural Research 8: 51-61.
- Medina-Cuevas H. L. y Z. Evangelista-Martínez. 2011. Aislamiento y búsqueda de actinobacterias del suelo productoras de enzimas extracelulares y compuestos con actividad antimicrobiana. Tecnociencia 5: 72-78.
- Miransari M. 2011. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. Microbiol Biotechnology 89: 917–930.
- Molina-Gayosso E. 2010. Búsqueda de control biológico de *Phytophthora capsici* en Chile mediante alta diversidad microbiana, considerando al patosistema como sistema adaptativo complejo. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 101 pp.
- Morán-Bañuelos S. H., V. H. Aguilar-Rincón, T. Corona-Torres y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana 33: 21-26.
- Newsham K. K., A. H. Fitter and A. R. Watkinson. 1995. Arbuscular mycorrhiza protects an annual grass from root pathogenic fungi in the field. J. Ecol. 83: 991-1000.
- Ozgonen H. and A. Erkilic. 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. Crop Protection 26: 1682-1688.
- Ríos-Labrada H, D. Vargas-Galindo, F. R. Funes-Monzote. 2011 Innovación agroecológica, adaptación y mitigación del cambio climático. Cuba 242 pp.

- Rodríguez del Bosque L. A. y H. C. Arredondo B. H. C. 2007. Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico México 303 p.
- Reyes-Tena A., E. E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez, y L. López-Pérez. 2012. Evaluación de hongos micorrízicos arbusculares aislados de *Agave cupreata* de Michoacán como biofertilizante en chile. Memorias del XXXVII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Zacatecas, México.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, (SIAP 2010). www.siap.gob.mx/ (Accesada 31 de Octubre 2012).
- Smith S.E. and Read D. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2ª edición. Capítulo 1. Academic Press.
- Trotta A., G. C.Varese, E. Gnani, A. Fusconi, S. Sampo, and G. Berta. 1996. Interactions between the soil-borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. Plant and Soil 185: 199–209.
- Xuan-Joa N., N. Kiaw-Wai, L. Young-Seong, T. Hamisi, L. Geon-Hyoung, J. Byoung-Kon, R. Hee-Myeong, K. Sang-Jun, J. Woo-Jin and K Kil-Young. 2012. Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. Plant Pathology 28: 282-289.

XII. ANEXO

12.1 Constancias y resúmenes de trabajos presentados.

ACTINOMICETOS Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE

*Alfredo Reyes Tena ⁽¹⁾, Evangelina E. Quiñones Aguilar ⁽²⁾, Sylvia Patricia Fernández Pavia ⁽¹⁾, Gerardo Rodríguez Alvarado ⁽¹⁾ Gabriel Rincón Enríquez ⁽²⁾, Luis López Pérez ⁽¹⁾. (1) Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la UMSNH. (2) Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Email: * eyesnator@hotmail.com

RESUMEN

La principal limitante en la producción del cultivo de chile a nivel mundial es la marchitez provocada por *Phytophthora capsici*, ésta ocasiona pérdidas de hasta un 80% de la producción. El control biológico de enfermedades de plantas es una alternativa al control químico. Los actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos antagonistas a agentes fitopatógenos. Se desarrollaron dos ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad antimicrobiana de 12 diferentes actinomicetos. Se encontró que todos los aislados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Phytophthora capsici*, resultando mejor la cepa ABV39 al inhibir hasta en un 86%. Con la finalidad de definir una aplicación combinada entre actinomicetos se determinó su compatibilidad en base a la ausencia de inhibición entre ellos. Para esto, se realizó un experimento *in vitro* de confrontación dual, resultando la combinación entre las cepas ABV02-ABV39 como adecuada, pues no mostraron inhibición entre ellos. La combinación incluye la cepa ABV39 que resultó ser la más efectiva para el control de *Phytophthora capsici*. Además de que ambas cepas son buenas para esporular facilitando su aplicación *in planta*. Se realizó un experimento en condiciones de invernadero para seleccionar los mejores consorcios de HMA en cuanto al crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile serrano y poblano. Se encontró que el consorcio nativo Cerro del Metate (CM) incrementó el crecimiento y la bioprotección en chile serrano. En chile poblano el consorcio LC promovió una mayor altura, sin embargo CM fue mejor en bioprotección ya que las plantas presentaron un menor índice de severidad de la enfermedad además de una mayor biomasa fresca aérea y radicular. En conclusión, todos los actinomicetos evaluados presentaron actividad antimicrobiana contra *Phytophthora capsici*, resultando la cepa ABV39 la más efectiva, que además resultó ser compatible con la cepa ABV02 en caso de una aplicación combinada *in planta*. El consorcio micorrízico CM promovió el mayor crecimiento y proporcionó la mayor bioprotección contra el patógeno en chile serrano y poblano.

Palabras clave: *Phytophthora capsici*, *Capsicum annuum*, antagonismo, biocontrol.



Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias

La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
a través del
Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas y
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

otorga la siguiente

CONSTANCIA

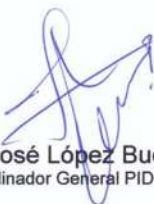
a:

**Alfredo Reyes Tena, Evangelina Esmeralda
Quiñones Aguilar, Gabriel Rincón Enríquez,
Sylvia Patricia Fernández Pavia y Luis López
Pérez**

Por su participación con la ponencia de tipo: Oral

**Actinomicetos y hongos micorrízicos arbusculares como
agentes de control biológico de la marchitez del chile**

En el marco de las actividades académicas del 5° Foro Académico del Posgrado
en Ciencias Biológicas y Agropecuarias celebrado del 9 al 11 de Diciembre, en el
Centro de Información Arte y Cultura. Morelia, Michoacán, México.


Dr. José López Bucio
Coordinador General PIDCB


Dr. Héctor Guillén Andrade
Coordinador General PIMCB



BIOPROTECCIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN CHILE POBLANO CONTRA *Phytophthora capsici* L.

Alfredo Reyes Tena^{1, 2}, Gabriel Rincón Enríquez² Sylvia P. Fernández Pavia¹, Gerardo
Rodríguez Alvarado¹, Evangelina E. Quiñones Aguilar², Luis López Pérez¹

Eje1. La investigación en las Ciencias Básicas

Mesa 3. Ciencias agrícolas y biotecnología

Resumen

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es de gran importancia económica, biológica y cultural en México; sin embargo, uno de los principales problemas en la producción es la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* L. El desarrollo de alternativas de control sustentables mediante la aplicación de microorganismos antagonistas como hongos micorrízicos arbusculares (HMA) resulta ser una alternativa prometedora al control químico. Con el objetivo de evaluar el efecto bioprotector de diferentes consorcios de HMA contra *P. capsici* en chile poblano, se realizó un diseño experimental completamente al azar bajo condiciones de invernadero evaluando 7 inóculos de HMA, un testigo positivo (*Rhizophagus intraradices*) y un testigo negativo (sin HMA) con 4 repeticiones. A los 56 días de haber inoculado a las plantas con los HMA, se midieron las variables altura de planta, diámetro del tallo, número de hojas, además del porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas de HMA en el sustrato. Posteriormente se inocularon las plantas con una suspensión de zoosporas de *P. capsici* (1×10^4) y, 21 días después de ésta inoculación, se evaluó el nivel de daño de las plantas mediante una escala de severidad visual. Así mismo, se registró la biomasa fresca aérea y radical. Los resultados del primer muestreo (56 días), no mostraron diferencias significativas en el número de hojas y diámetro del tallo, entre los tratamientos de HMA; sin embargo, en la altura de planta, el inóculo nativo las campesinas (LC) presentó el mayor valor con una media de 18.03 cm. Se encontraron porcentajes de colonización micorrízica de hasta un 93% en LC, todos los tratamientos inoculados con HMA fueron estadísticamente similares a excepción de El Huizachal (EH) donde se encontró un 43.4% y el control negativo donde no hubo colonización. Al final del experimento (77 días), las plantas inoculadas con el consorcio Cerro del Metate (CM) presentaron un menor índice de severidad de la enfermedad y obtuvieron una mayor biomasa fresca aérea y radical respecto al resto de tratamientos.

Palabras Clave: *Capsicum annuum*, marchitez, antagonismo, control biológico.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF-UMSNH); eyesnator@hotmail.com.

² Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Introducción

El cultivo de chile es una actividad económica importante en México, en el 2010 ocupó el primer lugar mundial en la producción de chile verde con 2.33 millones de toneladas (SIAP, 2010). Sin embargo, su producción enfrenta diferentes problemáticas principalmente aquellas ocasionadas por enfermedades, una de las más importantes es la marchitez provocada por *Phytophthora capsici* L. Esta enfermedad provoca la muerte prematura de la planta debido a una infección en las raíces o en la base del tallo, generalmente ocurre en campos mal drenados lo que incrementa la proliferación de la enfermedad (Ozgonen y Erkilic, 2007). Para el control de ésta enfermedad se utilizan diversos fungicidas químicos sin embargo, no logran resultados satisfactorios sobre el patógeno además que estos generan resistencia lo cual incrementa el costo de producción al adicionar una mayor cantidad del producto. Es por ello, que en la actualidad ha surgido interés por la búsqueda de alternativas de manejo sostenibles como el control biológico que consiste en la aplicación enemigos naturales contra el agente fitopatógeno.

Los Hongos Micorrízicos arbusculares (HMA) han sido estudiados en su papel como bioprotectores de enfermedades de plantas, se sabe que establecen una simbiosis mutualista con las raíces favoreciendo a la planta en una mayor asimilación de nutrientes minerales y agua. La mejora nutricional permite a la planta tener mayor resistencia y/o tolerancia a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. Además estos hongos son capaces de competir con fitopatógenos por espacio y nutrientes (Trotta *et al.*, 1996). Los HMA también pueden inducir resistencia sistémica (RSI) en las plantas al encender su sistema de alerta al momento de colonizar la raíz y activar fitohormonas en el cual están involucrados el ácido jasmónico y el etileno que conllevan a la síntesis de sustancias tóxicas para el fitopatógeno como las fitoalexinas (Ozgonen y Erkilic, 2007) y proteínas relacionadas con la patogénesis (Madriz-Ordeñana, 2002). Aunado a la RSI, la simbiosis micorrízica estimula una respuesta muy sensitiva en la planta ante la presencia de un agente fitopatógeno evitando su establecimiento, este mecanismo es conocido como “priming”.

La posible aplicación de los HMA en el control biológico de enfermedades cada vez cobra un mayor interés en la investigación de alternativas de manejo en un enfoque sustentable, es por ello que en este trabajo se evaluó la bioprotección de HMA en plantas de chile poblano contra *Phytophthora capsici*.

Objetivo

- Determinar el efecto benéfico por parte de diferentes inóculos de HMA en la promoción del crecimiento y la bioprotección de plantas de chile poblano frente a *Phytophthora capsici* en condiciones de invernadero.

Materiales y Métodos

Se realizó un diseño experimental en bloques al azar bajo condiciones de invernadero evaluando 7 consorcios de HMA: El Huizachal (EH), Las Campesinas (LC), Rancho Carlos Rojas (RCR), Paso Ancho (PA), El limón (EL), Cerro del Metate (CM), Barranca de las Nueces (BN), un control positivo que fue un producto comercial a base de *Rhizophagus intraradices* producido por el INIFAP, y un control sin inóculo (S/HMA). Se generaron 9 tratamientos con 4 repeticiones para un total de 36 unidades experimentales distribuidas en 4 bloques completos al azar. Cada unidad experimental consistió en una maceta con una planta de chile con el tratamiento correspondiente. Las semillas de chile poblano cultivar San Luis se germinaron en charolas de aluminio con arena estéril y cuando tuvieron las primeras hojas verdaderas, se trasplantaron a vasos de unicel de 475ml de capacidad utilizando como sustrato una mezcla de suelo-arena estéril en proporción 1:1v/v. Al momento del trasplante, las plantas se inocularon con 80 esporas por cada inóculo de HMA cubriendo completamente el sistema radical de la planta (Fig. 1). Posteriormente, a los 72 días después del trasplante con los HMA, todas las plantas se inocularon con una suspensión de zoosporas de *P. capsici* ajustada a una concentración de 1×10^4 de acuerdo a la técnica de Ristaino (1990). Las variables de respuesta evaluadas fueron: variables de crecimiento, se midieron cada 14 días durante 8 semanas a partir del trasplante y fueron: altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas. Variables microbiológicas: colonización micorrízica en raíz y número de esporas en el sustrato a los 60 días después del trasplante. Variables de bioprotección: a los 76 días del trasplante o 21 días de la inoculación de *P. capsici* donde se evaluó el nivel de severidad de la enfermedad en las plantas mediante la comparación con una escala de virulencia de 6 niveles descrita por Quinto-Álvarez (2014). Además en esta fecha se determinó la biomasa fresca de la parte aérea y radical. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tukey con un 95% de confianza, para las variables de crecimiento y microbiológicas. Para la escala de severidad se realizó un ANOVA no paramétrico aplicando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn para determinar las diferencias estadísticas entre las medianas de los tratamientos. Los análisis se realizaron en el software Statgraphics Centurion XV.II.



Figura 1. Inoculación de plantas con los HMA.

Resultados

En las variables de crecimiento no existieron diferencias estadísticamente significativas para diámetro del tallo ($p = 0.71$) y número de hojas ($p = 0.63$), solamente se encontraron diferencias significativas para altura de planta ($p = 0.0003$) en donde el inóculo LC fue estadísticamente superior al resto con una media de 18.03 cm (Fig. 2).

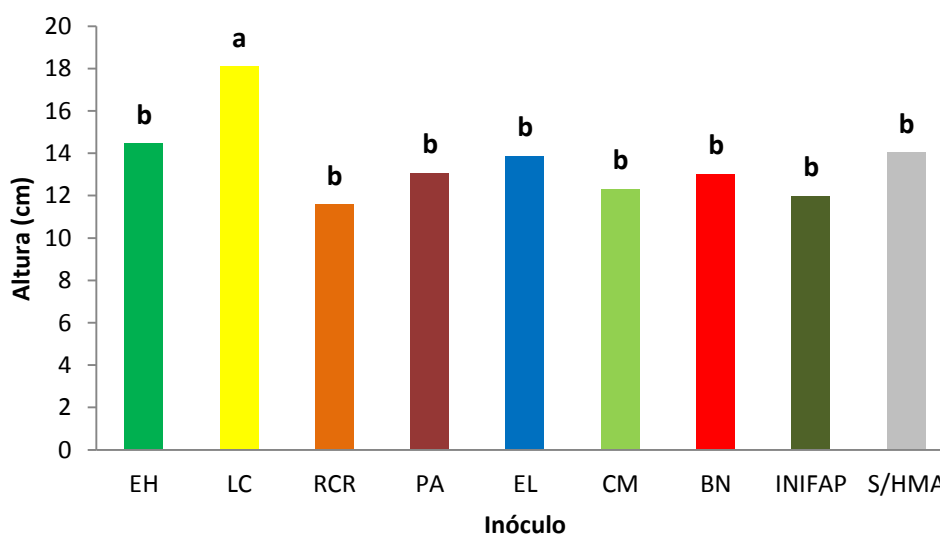


Figura 2. Altura de plantas de chile poblano a los 56 días después del trasplante. Letras diferentes en columnas indican diferencia estadística según Tukey ($p < 0.05$).

En las variables microbiológicas, se encontró una alta colonización micorrízica hasta un 93.3% en el inóculo LC seguido de PA y RCR con un 90% y 86.83% respectivamente, el menor porcentaje (43.4%) se encontró en EH (Fig. 3 a). El inóculo EH promovió una mayor número de esporas en sustrato con 406 y el inóculo comercial presentó una menor cantidad de esporas con 130 (Fig. 3 b) lo que no se correlacionó con la colonización micorrízica.

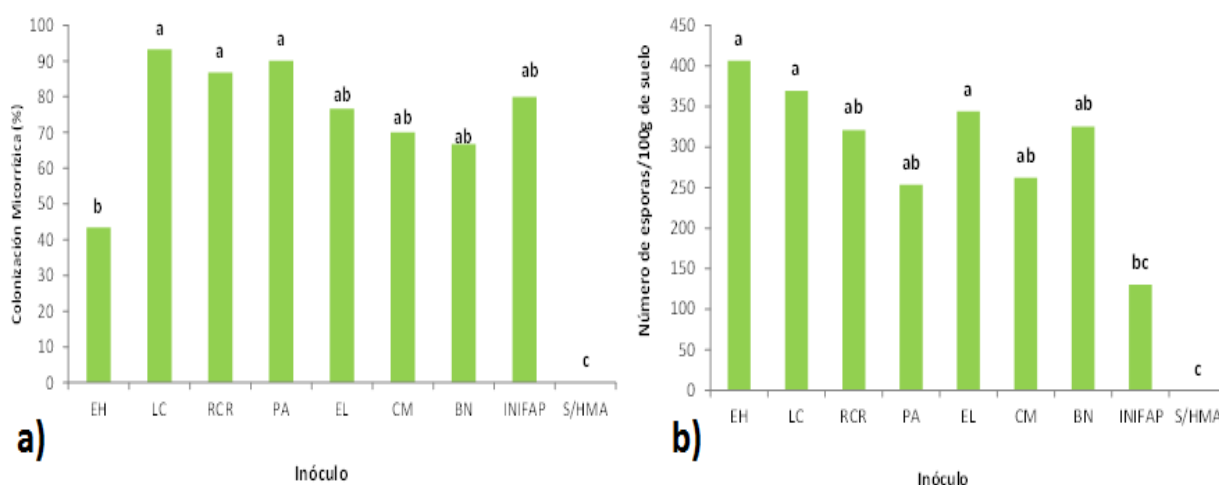


Figura 3. a) Colonización micorrízica a los 60 días después del trasplante; b) Número de esporas en 100 g de suelo seco. Letras diferentes en columnas representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$).

La escala de virulencia utilizada para este experimento contempla 6 niveles de severidad que va de 0 (planta sana) hasta 6 (planta muerta). Al hacer la comparación visual del daño de acuerdo a la escala de virulencia se encontró que las plantas inoculadas con CM presentaron un nivel de severidad de 1 en comparación con el resto, le siguieron las plantas del consorcio EL donde las plantas presentaron un índice de severidad de 2 y 3 al igual que el consorcio EH. El inóculo BN prácticamente no tuvo ningún efecto bioprotector sobre *P. capsici* al presentar las plantas un índice de severidad de 5 y 6, inclusive las plantas de este tratamiento se encontraban con mayor nivel de daño que el control S/HMA el cual tuvo un nivel de severidad similar a los inóculos RCR y LC (Fig. 4). Si comparamos estos resultados con la biomasa fresca registrada a los 76 días después del trasplante, encontramos que el inóculo CM (que tuvo el mejor efecto bioprotector sobre *P. capsici*) fue el que presentó una mayor biomasa fresca al presentar valores de 6.95 g en biomasa fresca aérea y 2.82 g en biomasa fresca radicular al final del experimento (Fig. 5). Esto refleja que ciertos inóculos de HMA promueven un efecto positivo en la protección contra *P. capsici*, y por consecuente una mayor biomasa después de la inoculación con el patógeno.

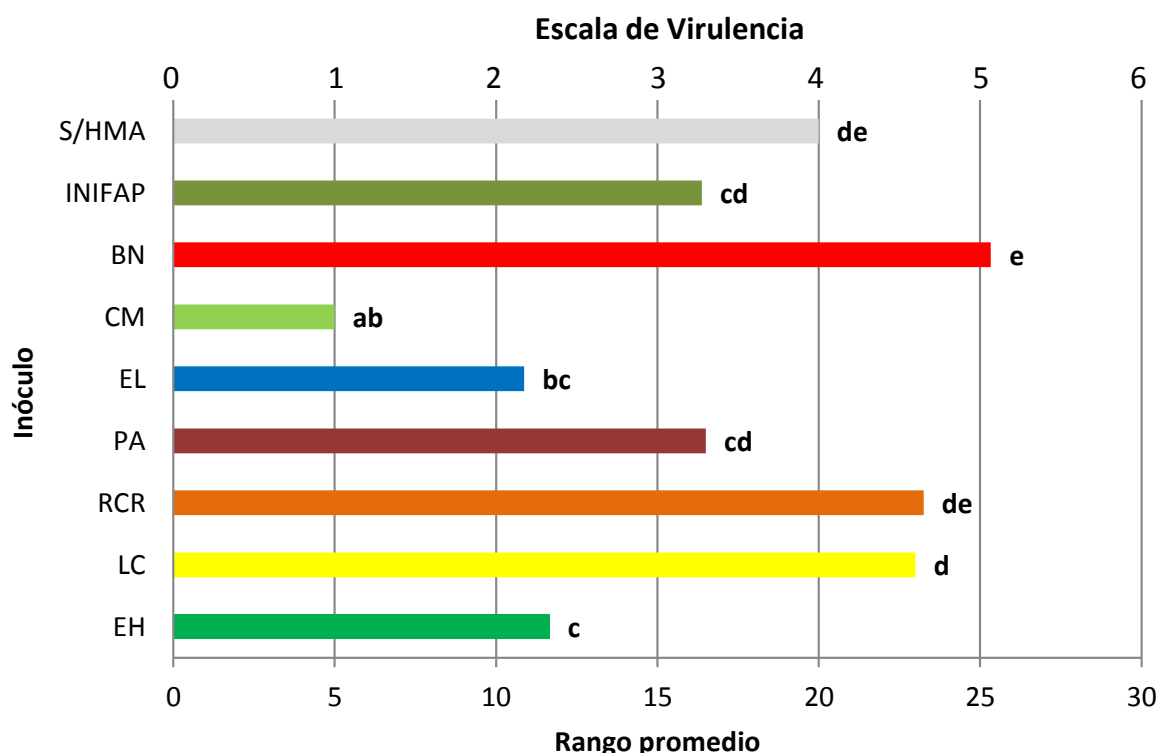


Figura 4. Nivel de severidad en base a la escala de virulencia en plantas de chile poblano a 21 días después de la inoculación de *P. capsici*. Letras diferentes en barras representan tratamientos estadísticamente diferentes (Dunn $p < 0.05$).

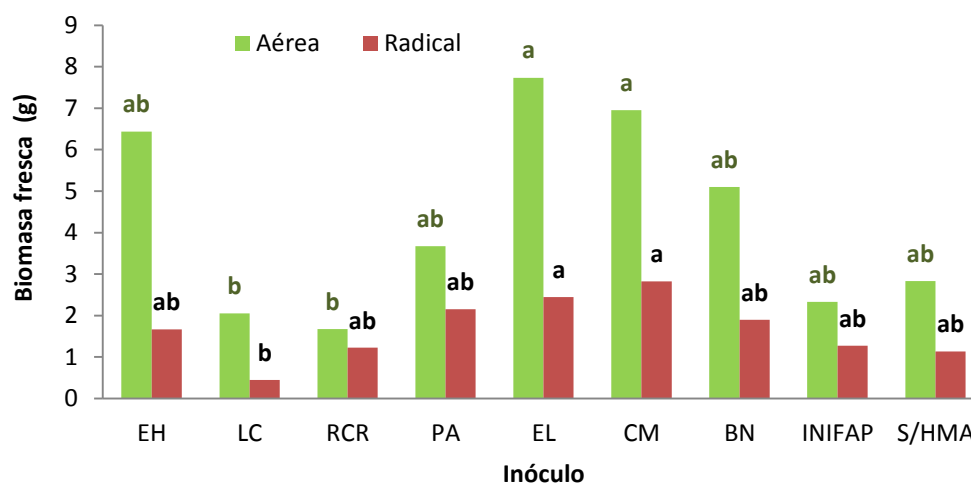


Figura 5. Biomasa fresca aérea y radical de plantas de chile poblano a los 21 días después de la inoculación de *P. capsici*. Letras diferentes en columnas representan tratamientos estadísticamente diferentes según Tukey ($p < 0.05$).

Conclusiones

No se encontraron diferencias significativas en diámetro de tallo y número de hojas. El consorcio Las Campesinas (LC) promovió una mayor altura de planta; sin embargo, al final del experimento el consorcio Cerro del Metate (CM) promovió una menor incidencia de la enfermedad y una mayor biomasa fresca que los demás consorcios por lo tanto, éste inóculo sería el más recomendable de utilizar como promotor del crecimiento y bioprotector contra *Phytophthora capsici* en plantas de chile poblano cultivar San Luis.

Referencias bibliográficas

- Madriz-Ordeñana K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas. 63) 22-32.
- Ozgonen H. and A. Erkilic 2007. Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungal inoculation in pepper. Crop Protection. 26: 1682-1688.
- Quinto-Álvarez, Carla Paola. 2014. Nuevas alternativas de control biológico de *Phytophthora capsici* LEO. Causante de la marchitez en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis para obtención de grado de Maestría en producción Agropecuaria con opción terminal agrícola. UMSNH.
- Ristaino J. B. 1990. Intraespecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. Phytopathology 80: 1253-1259.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, (SIAP) 2010. (www.siap.gob.mx).
- Trotta A., G. C.Varese, E. Gnani, A. Fusconi, S. Sampo, and G. Berta. 1996. Interactions between the soil-borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. Parasítica and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. Plant and Soil 185: 199–209.



SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS ANTAGONISTAS A DIFERENTES CEPAS DE *Phytophthora capsici*. [Selection of actinomycetes antagonistic to different strains of *Phytophthora capsici*] Alfredo Reyes-Tena^{1, 2}, Sylvia Fernández-Pavía², Gabriel Rincón-Enríquez¹, Luis López-Pérez² y Evangelina Quiñones-Aguilar¹. ¹CIATEJ, ²IIAF-UMSNH. equinones@ciatej.mx. Patrocinador FOMIX-Aguascalientes: proyecto-181930.

Los actinomicetos o actinobacterias son los principales productores de antibióticos en la naturaleza, cualidad que permite su aplicación biotecnológica en el biocontrol de enfermedades vegetales al inhibir el crecimiento de los agentes causales. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar aislados de actinomicetos con actividad antagónica *in vitro* contra *Phytophthora capsici* (PC) agente causal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.). Se realizó un primer experimento de antagonismo bajo un diseño experimental completamente al azar, donde se evaluaron 12 cepas del género *Streptomyces* contra tres cepas de diferente procedencia de PC incluyéndose un testigo de cada cepa, con un total de 39 tratamientos y cuatro repeticiones; posteriormente se realizó otro experimento de confrontación dual entre los 10 mejores aislados de actinomicetos y dos cepas de PC, el diseño experimental fue completamente al azar con 22 tratamientos y cuatro repeticiones incluyéndose controles sólo con el patógeno. En ambos experimentos se midió el área de inhibición del crecimiento de PC (AIPC) respecto al control sin actinomiceto, expresado en porcentaje. Los análisis de varianza y pruebas de Tukey ($p \leq 0.05$) se realizaron con Statgraphics. En el primer experimento, todos los actinomicetos presentaron un AIPC cercana al 100% contra las tres cepas de PC. En el segundo experimento, donde se evaluó el desempeño individual de cada actinomiceto, los aislados ABV39, ABV45 y ABV38 fueron estadísticamente superiores ($p \leq 0.05$) al presentar una AIPC de entre 63 al 86%. Esto sugiere que estos aislados de actinomicetos podrían emplearse en el control de PC *in planta* a nivel de invernadero y/o campo.



ACTIVIDAD INHIBITORIA ENTRE ACTINOMICETOS ANTAGONICOS A *Phytophthora capsici* PARA LA ELABORACION DE FORMULACIONES

[Inhibitory activity between actinomycetes antagonistic to *Phytophthora capsici* to prepare formulations] Alfredo Reyes-Tena^{1,2}, Sylvia Fernández-Pavía², Gabriel Rincón-Enríquez¹, Luis López-Pérez² y Evangelina Quiñones-Aguilar^{1*}. ¹CIATEJ, ²IIAF-UMSNH. *equinones@ciatej.mx. Patrocinador FOMIX-Aguascalientes: proyecto-181930.

El empleo de actinomicetos como agentes de biocontrol de fitopatógenos requiere de conocimientos sobre la compatibilidad entre cepas para determinar su posible aplicación conjunta y así potencializar su efecto. Los actinomicetos como productores de compuestos antimicrobianos, podrían inhibirse entre ellos. Con base en esta hipótesis, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad antagónica entre aislamientos de actinomicetos (cepas) con actividad inhibitoria sobre *Phytophthora capsici* (PC). Se realizó un experimento en cultivo dual bajo un diseño experimental completamente al azar, confrontándose 13 cepas de actinomicetos (cada cepa con las doce restantes), obteniéndose un total de 78 combinaciones con tres repeticiones. Para medir la compatibilidad/antagonismo entre los diferentes actinomicetos se propuso una escala ordinal de inhibición del crecimiento, contemplando niveles de 0 a 5 desde ausencia de inhibición hasta inhibición completa de una cepa sobre otra. La inhibición del crecimiento de una cepa sobre otra, se midió a los 21 días después de establecido el experimento. Diferentes combinaciones entre cepas presentaron un nivel de inhibición cero, indicando su posible aplicación conjunta en el control de PC *in planta*. La cepa ABV02 inhibió en diferente nivel a todos los actinomicetos evaluados, por lo que podría ser incompatible al momento de realizar una formulación que incluya varias cepas. Las cepas ABV65, ABV37 y *Streptomyces lydicus* (Comercial) inhibieron a diez cepas, mientras que ABV25, ABV39 y ABV46 inhibieron únicamente a una cepa por lo que se concluye que existe mayor compatibilidad entre algunas cepas, información que se empleará al momento de combinar actinomicetos en una formulación.



ACTINOMICETOS Y HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES COMO AGENTES DE CONTROL BIOLOGICO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE

*Alfredo Reyes-Tena (1), Evangelina E. Quiñones-Aguilar (2), Sylvia Patricia Fernández-Pavia (1), Gerardo Rodríguez Alvarado (1), Gabriel Rincón-Enríquez (2), y Luis López-Pérez (1). (1) Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales IIAF-UMSNH, (2) Centro de Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). E-mail: eyesnator@hotmail.com.

El cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) representa una actividad económica importante en México ya que es uno de los principales productores de chile verde a nivel mundial. Una de las principales problemáticas que enfrenta este cultivo son las enfermedades en donde la marchitez causada por *Phytophthora capsici* es la más devastadora. Los métodos de control aplicados en los sistemas de producción a base de fungicidas químicos no controlan eficientemente a la enfermedad y ocasionan daños medioambientales. Una alternativa al control químico es el control biológico (CB) que consiste en la aplicación de organismos con actividad antagónica hacia agentes patógenos. Entre los beneficios del CB está su baja toxicidad y la reducción de costos debido a que el agente de control es capaz de autoperpetuarse. Uno de los grupos de microorganismos antagónicos a patógenos de plantas son los actinomicetos los cuales inhiben la germinación de esporas de hongos fitopatógenos mediante producción de antibióticos y enzimas degradativas de la pared. Por otro lado es conocido que los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) actúan de forma sinérgica con actinomicetos en la prevención y control de enfermedades en las raíces de plantas mediante bioprotección mecánica, competencia e inducción de resistencia en la planta. El CB usando actinomicetos-HMA ha sido poco estudiado contra Oomycetes del género *Phytophthora*. Por lo que este trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de los actinomicetos y HMA en el biocontrol de *P. capsici* en chile, para esto primero se evaluará el efecto antagónico a nivel in-vitro de diversas cepas de actinomicetos contra diferentes cepas de *P. capsici* previamente aisladas de suelos cultivados con chile. Posteriormente en otro experimento los mejores actinomicetos se probarán en plantas de chile previamente micorrizadas con consorcios de HMA en macetas que contendrán sustrato proveniente de cultivos infestados con *P. capsici* e inoculado artificialmente en macetas con sustrato estéril.

Palabras clave: *Capsicum annum*, *Phytophthora capsici*, biocontrol.



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FORO
ACADÉMICO DEL POSGRADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

**LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
A TRAVÉS DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OTORGAN LA PRESENTE**

CONSTANCIA

**Alfredo Reyes-Tena, Evangelina E. Quiñones-Aguilar, Sylvia
Patricia Fernández-Pavía, Gabriel Rincón-Enríquez, y Luis
López-Pérez**

Por su participación con la ponencia de tipo: Cartel

**ACTINOMICETOS Y HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES COMO AGENTES
DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE**

En el marco de las actividades académicas del 4o Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias celebrado del 4 al 6 Diciembre de 2013, en el Centro de Información, Arte y Cultura de Ciudad Universitaria en Morelia Michoacán.



Dr. José López Bucio
Coordinador General
PIDCB



Dr. Juan Manuel Ortega Rodríguez
División de Estudios de Posgrado
Fac. de Biología



Dr. Hector Guillén Andrade
Coordinador General
PIMCB

