



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación

Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Parasitología Agrícola
Tema estratégico (ANA/PEP):	Doctorado en Ciencias en Parasitología Agrícola				
Línea de investigación:	Fitopatología				
Título del proyecto:	Manejo de consorcios microbianos como biocontrol de la marchitez del cultivo de chile (<i>Capsicum annum</i> L.)				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	75,000.00	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	X	Tecnológica	e-mail del responsable gabgalmor@yahoo.com.mx
Vinculación:	Si	No	Fondos concurrentes:		
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Saltillo, Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo				
A realizar durante el(los) año(s):	2018-2019				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dr. Gabriel Gallegos Morales	3611	3237		
Colaborador:	Dra. Yisa María Ochoa Fuentes	3611	3948		
Colaborador:	Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo	3611	2022		
Colaborador:	Dr. Reinaldo Méndez Aguilar	Externo	Inifap		
Colaborador:	Dr. Raúl Rodríguez Guerra	Externo	Inifap		
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	M. C. César Alejandro Espinoza Ahumada	Doctorado	41041339		
Programa Docente:	Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello	 Unidad Autónoma Agraria Antonio Narro Depto. Parasitología				
Nombre	Dr. Ernesto Cerna Chávez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2018

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Manejo de consorcios microbianos como biocontrol de la marchitez del cultivo de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.)	75,000.00
--	-----------

2.- Introducción

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las hortalizas más importantes alrededor del mundo. La pungencia y el color son los atributos más importantes de este cultivo utilizado ampliamente en los productos alimenticios y en diversas aplicaciones farmacológicas. En México la superficie sembrada de chile es de 171,791 ha, con un rendimiento promedio de 18.27 ton/ha; los principales estados productores son Chihuahua (41,143), Zacatecas (40,866), San Luis Potosí (23,058) y en particular el estado de Tamaulipas participa con 1,004 (SIAP, 2016).

El cultivo del chile es afectado por diversas enfermedades causadas por microorganismos que limitan el rendimiento y la calidad de su producto. La enfermedad conocida como "marchitez del chile" provoca la muerte prematura de las plantas. Esta es causada principalmente por una obstrucción de los haces vasculares, luego de ocurrir la infección principalmente por *Phytophthora capsici* Leo., pero también hay otros patógenos involucrados como *Rhizoctonia solani* (Pomar *et al.*, 2001), *Fusarium oxysporum* Schlechtend. (Black *et al.*, 1993) y *Verticillium* spp. (Agrios, 2001).

Se han sugerido prácticas de manejo de la marchitez del chile basadas en el comportamiento biológico y ecológico del patógeno, una de estas prácticas incluye el uso de agentes de biocontrol para reducir las poblaciones del patógeno resistentes a pesticidas y disminuir el número de aplicaciones de estos últimos. Entre los organismos estudiados como agentes de biocontrol contra la enfermedad se encuentran *Bacillus* spp. (Guillen *et al.*, 2006) y *Trichoderma* spp. (Guigón *et al.*, 2006) y actinomicetos (Prashith *et al.*, 2010). Aunque tres especies de bacterias se han evaluado por su eficiencia combinada como agentes de biocontrol contra fitopatógenos asociados a la marchitez del chile, es importante considerar la especificidad de los mecanismos de acción e interacción de los microorganismos en combinación (Guillen *et al.*, 2006).

Objetivos

- Identificar los agentes asociados a la marchitez del chile y evaluar la actividad antifúngica de consorcios microbianos para el manejo de la enfermedad.

Hipótesis

Al menos una de las combinaciones de agentes microbianos tendrá efecto sinérgico para el control de la marchitez del cultivo de chile.

3.-Revisión de Literatura

La pudrición de la raíz del chile para secado en el norte centro de México se encuentra asociada con un grupo de patógenos entre los que se encuentran *Phytophthora capsici* Leo., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. y *Verticillium* spp. (Velásquez *et al.*, 2001).

Frecuentemente es posible encontrar dos o más de estos patógenos en las raíces de una sola planta aunque probablemente solo uno de ellos sea el responsable de los síntomas que expresa la planta, mientras que el otro u otros patógenos se desarrollan sobre el tejido muerto de la raíz o afectado por el primer patógeno. Los síntomas aéreos y subterráneos que producen estos patógenos son muy parecidos entre sí por lo que el conjunto de síntomas que muestra una planta frecuentemente es de poca utilidad para determinar el o los agentes causales y los cuales solamente pueden identificarse al ser aislados en un laboratorio especializado.

En plantas adultas la marchitez es el síntoma más común e inicial de las plantas infectadas por estos patógenos. Al inicio de la enfermedad este síntoma es más severo al mediodía y puede ser atribuido a la falta de humedad en el suelo; al caer la tarde las plantas infectadas recuperan algo de su vigor pero en pocos días la marchitez es permanente y aparecen otros síntomas de la enfermedad como una coloración verde opaco en la mayor parte del follaje que contrasta con el verde brillante de las plantas sanas. Además de la coloración verde opaco del follaje, es común observar el ápice y bordes de las hojas con una coloración café – marrón rodeada por un área de color verde opaco; la lesión café puede llegar a cubrir toda la hoja que usualmente permanece adherida a la planta. Generalmente las plantas infectadas producen botones, flores y presentan frutos en distintos grados de desarrollo, sin embargo, al avanzar la enfermedad y reducirse el abastecimiento de agua y nutrientes (como consecuencia de la destrucción de raíces), los botones, flores y frutos más jóvenes se desprenden de la planta. Al examinar los pedúnculos de botones,

flores y frutos pequeños es común observar una coloración amarilla mientras que en frutos más desarrollados se puede observar una lesión café que probablemente es responsable por la caída de esos frutos. Los frutos con mayor desarrollo al inicio de la enfermedad son los únicos que pueden adquirir un tamaño y valor comercial completo. Los síntomas subterráneos más comunes son la pudrición del cuello o porciones de la raíz principal así como el necrosamiento de las raicillas secundarias, lo que impide el paso del agua y nutrientes hacia el follaje de la planta así como el flujo de carbohidratos hacia las raíces. Dos de los síntomas más frecuentemente encontrados en las raíces de plantas de Chile son el descortezamiento (la raíz se "pela") provocada por *Phytophthora* spp. y la coloración café o negra que toman los haces vasculares en la raíz principal de las plantas infectadas por *Verticillium* spp. (Sanogo y Carpenter, 2006).

Las medidas sugeridas para el manejo de esta enfermedad son de carácter "preventivo" ya que actualmente no se conoce algún fungicida que controle eficientemente esta enfermedad, ni se cuenta con variedades de Chile para secado que sean resistentes a los patógenos involucrados en la enfermedad. Sin embargo, el éxito en el manejo de la pudrición de la raíz de Chile se basa en la realización de todas las prácticas dirigidas a prevenir más que a tratar de controlar la enfermedad una vez que se observan los síntomas en el campo (Velásquez *et al.*, 2013).

El uso de microorganismos antagonistas en los últimos años ha tomado mucha relevancia. En la investigación realizada por Hernández *et al.*, (2014), al trabajar con diferentes especies del género *Bacillus* determinó que estas expresaron en la planta de Chile mayor altura (28 % en promedio) y hasta 70 g de incremento de peso de los frutos. Las cepas de *Bacillus* presentaron una longitud de la raíz de 43,6 cm en promedio y con una tendencia a producir mayor peso seco de raíz. La incidencia del Testigo químico y absoluto mostró 60 y 40%, respectivamente, mientras que las cepas de *Bacillus* un 10% y una severidad mayor en el Testigo absoluto seguido por el tratamiento químico. Por lo anterior se determinó que las cepas de *Bacillus* mostraron efectividad como agentes de biocontrol contra los fitopatógenos asociados a la marchitez de Chile y se demostró que incrementan el rendimiento y mayor desarrollo de las plantas tratadas con las cepas de *Bacillus*.

4.- Procedimiento Experimental

Ubicación del experimento. Se tomarán muestras de plantas de Chile con síntomas de marchitez de lotes agrícolas comerciales del Estado de Tamaulipas. Las muestras se trasladarán al laboratorio del INIFAP del Sur de Tamaulipas; donde se procesarán para el aislamiento de fitopatógenos causantes de la enfermedad.

Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos. Se lavarán con agua corriente las raíces de plantas con síntomas de marchitez, las cuales se secarán a temperatura ambiente, enseguida se cortarán porciones de tejido sano y enfermo, y se desinfectarán externamente con hipoclorito de sodio al 3%, lavándose tres veces consecutivas con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloro. Posteriormente, se colocarán en papel estroza estéril para secarse. Los trozos desinfectados se sembrarán en medio V8 agar para el aislamiento de *Phytophthora*, y en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para aislar a *Fusarium*, *Verticillium* y *Rhizoctonia*, incubándose por 5 d a 28 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se aislarán en nuevas cajas conteniendo el mismo medio, respectivamente, y se incubarán por 24 h a 28°C y se realizará la purificación a través del método de punta de hifa. En base a cultivos puros de los hongos fitopatógenos se identificarán por sus características morfológicas y crecimiento de la colonia en el medio de cultivo. Se utilizarán claves taxonómicas de Leslie y Summerell (2006), Inderbitzin *et al.* (2011), Barnett and Hunter (1998) y Erwin and Ribeiro (1996), para identificar las especies de los géneros *Fusarium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*, respectivamente.

Pruebas de patogenicidad *in vitro*. La patogenicidad de los aislados de hongos fitopatógenos, se evaluará *in vitro* (Sánchez *et al.*, 1975) sumergiendo semillas desinfectadas de Chile serrano variedad Tampiqueña, en una suspensión de conidios, esporangias y micelio de cada fitopatógeno los cuales se producirán en medio de PDA y V8. Las semillas inoculadas se incubarán sobre placas con Agar-Agua (AA) a 28°C, durante 7 días. Se evaluará la incidencia de plántulas con síntomas y la severidad de cada patógeno mediante la siguiente escala: 0= sin síntomas visibles; 1= puntos necróticos aislados en el hipocótilo y/o en hojas cotiledonales; 2= oscurecimiento en la base del hipocótilo (bh); 3= lesión necrótica (ln) de 1-5 mm en bh; 4= ln de 6-10 mm en bh; 5= ln mayor a 11 mm en bh.

Pruebas de patogenicidad *in vivo*. Para la siembra se utilizará la semilla de Chile serrano variedad Tampiqueña, se realizará en charolas de 60 cavidades previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3%, se utilizará peat moss como sustrato, se establecerá en invernadero bajo un diseño completamente al azar. Una vez que las plantas alcancen 10 cm se trasplantarán a bolsas plásticas de 25 x 25 cm. Se inoculará la suspensión de conidios,

esporangias y micelio de cada fitopatógeno. Se realizarán evaluaciones cada 15 días.

Identificación taxonómica de hongos fitopatógenos. Se realizarán una vez obtenidos los cultivos puros, para lo cual se utilizarán diferentes medios de cultivos para diferenciar características de crecimiento del micelio. Se definirá la especie en base a las características morfológicas, con las observaciones en el microscopio compuesto.

Antagonismo de especies de los antagonistas. Las acciones antagonistas se realizarán a través de confrontación dual en el medio PDA. Las placas se incubarán a 28°C durante 10 d, se realizarán mediciones cada 24 h del crecimiento radial micelio del patógeno y antagonista de cada uno de los tratamientos. Se determinará el grado de micoparasitismo de los antagonistas, a través de la escala propuesta por Ezziyyani et al. (2004), mostrada en la Tabla 1. Así mismo, se evaluará el porcentaje de inhibición de crecimiento radial, a través de la fórmula de Ezziyyani et al. (2004): $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$. Donde R1 y R2 son los radios mayor y menor respectivamente de crecimiento radial de los patógenos.

El efecto de las combinaciones de los antagonistas se medirá a través de la fórmula:

FIC de ant. A= MIC ant. A en combinación con ant. B/MIC de ant. A solo

FIC de ant B= MIC ant. B en combinación con ant. A/MIC de ant. B solo

FIC=FIC_A + FIC_B

Tabla 1. Escala para evaluación de la capacidad antagónica

Grado Capacidad antagónica

- 0 Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
- 1 Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
- 2 Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
- 3 Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
- 4 Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporula sobre ella.

Pruebas de efectividad biológica en campo. Las pruebas de campo se realizarán en un diseño de bloques al azar, con 3 repeticiones. Se utilizará la variedad tampiqueña serrano, con plántulas de 45 dde.

Análisis de los datos. Se realizará un Análisis de varianza (ANVA) y una comparación de medias tukey ($p=0.05$), utilizando el programa estadístico SAS 9.0.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Muestreos en Tamaulipas	X	X	X	X								
Aislamiento de fitopatógenos	X	X	X	X								
Identificación taxonómica		X	X	X								
Pruebas de patogenicidad			X	X								
Identificación molecular			X	X	X							
Congreso de fitopatología							X					
Pruebas de efectividad biológica <i>in vitro</i>					X	X						
Pruebas de efectividad biológica en campo					X	X	X	X	X			
Elaboración de manuscrito para artículo científico										X	X	
Envío de manuscrito para artículo científico												X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
1 Muestreos en Tamaulipas			5%									
2 Aislamiento de fitopatógenos				10%								
3 Identificación taxonómica				5%								
4 Pruebas de patogenicidad				5%								
5 Identificación molecular					20%							
6 Congreso de fitopatología							10%					

7 Pruebas de efectividad biológica <i>in vitro</i>						15%							
8 Pruebas de efectividad biológica en campo										20%			
9 Elaboración de manuscrito para artículo científico												5%	
10 Envío de manuscrito para artículo científico													5%

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- 1 Artículos científicos y presentación oral en 1 congresos nacional e internacional

6.-Literatura Citada

- Agrios G N (2001) Fitopatología. Ed. Limusa. México, D.F. 759 p.
- Black L L, K S Green, L G Hartman, M J Poulos (1993) Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center. Publication No. 91-347. Shanhua, Taiwan.
- Bosland P W, J E Votava (2000) Peppers: Vegetable and Spices Capsicums. Crop Production Science in Horticulture No. 12. CAB International. Las Cruces, New Mexico, USA. 204 p.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., and Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In Anales de Biología (No. 26, pp. 61-68).
- Guigón, L. C., Macías, L. B.C., Avila, Q. G., Lujan, F. M., Quiñones, P. F.J., Chavez, S. N., Berzoza, M. M. y Acosta, R. G.F. (2006). Validación y transferencia del uso de *Trichoderma* sp. en el cultivo del chile en la región de Delicias, Chih. Tercera Convención Mundial de Chile. Chihuahua y Delicias, Chihuahua, México. pp:173-178.
- Guillén, C. R., Hernández, C. F., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C., Padrón, C. E. y Reyes, V. M. (2006). *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 24:105-114.
- Hernández-Castillo, F. D., Lira-Saldivar, R. H., Gallegos-Morales, G., Hernández-Suárez, M., & Solis-Gaona, S. (2014). Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. Phytón (Buenos Aires), 83(1), 49-55.
- Pomar F, M A Bernal, J Collar, J Díaz, C Caramelo, C Gayoso, M Novo, C Prego, A Saavedra, C Silvar, F Merino (2001) A survey of "tristeza" of pepper in Galicia and the fungal pathogens causing the disease. Capsicum Eggplant Newslet. 20:90-93.
- Prashith, K., Shobha, K. S. and Onkarappa, R. (2010). Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. J. Pharmacy Res. 3:250-6.
- Sanogo, S. and Clary, M. 2008. Bacterial leaf spot of chile pepper: a short guide for growers. New Mexico State University. New Mexico Chile Association. Report 30. 8 p.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Disponible en (http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do)
- Velásquez Valle, R., Reveles Torres, L. R., y Reveles Hernández, M. (2013). Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el Norte centro de México.
- Velásquez, V.R., Medina, A.M.M. y Luna, R.J.J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:175-181.
- Anaya, L. J. L., González, C. M. M., Villordo, P. E., Rodríguez, G. R., Rodríguez, M. R., Guevara, G. R. G., y Torres, P. I. (2011). Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 2(3), 373-383. En línea. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000300006.
- Barnett, H. L., and Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Minnesota. P. 218.
- Erwin, D.C., and O. K. Ribeiro, (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. xi-xii, 269-276 pp.
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., and Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In Anales de Biología (No. 26, pp. 61-68).

- Hernández, C. F. D., Lira, S. R. H., Gallegos, M. G., Hernández, S. M., y Solis, G. S. (2014). Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de Bacillus y su efecto en el crecimiento y rendimiento. *Phyton* (Buenos Aires), 83(1), 49-55. En línea. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-56572014000100007&script=sci_arttext&tlng=en
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., and Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and Taxonomy of the Fungal Vascular Wilt Pathogen *Verticillium*, with the Descriptions of Five New Species. *PLoS ONE*, 6(12), e28341. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0028341>
- Leslie JF and Summerell BA. (2006). *The Fusarium Burkinafaso*. Laboratory manual. Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa.
- Sánchez, L. E., Endo, R. M. and Leary, J. V. (1975). A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing Crown and root rot of tomato. *Phytopathology* [online]., vol. 65. 726-727; doi:10.1094/Phyto-65-726.
- Silva, R. H. V., Fernández, P. S. P., Góngora, C. C., Macías, L. B. C., y Ávila, Q. G. D. (2009). Distribución espacio temporal de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista mexicana de fitopatología*, 27(2), 134-147. En línea. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092009000200006&script=sci_arttext&tlng=pt