



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):	Producción				
Línea de investigación:	Fitopatología				
Título del proyecto:	Sinergismo de tres especies de <i>Bacillus</i> para el manejo de hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del chile.				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	75,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	x	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	No	Fondos concurrentes:		
Cooperante(s):					
Entidad (es):	Saltillo, Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo, coahuila				
A realizar durante el(los) año(s):	2017-2018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Gabriel Gallegos Morales	3611	3237		
Colaborador:	Francisco Daniel Hernández Castillo	3611	2022		
Colaborador:	Rodolfo Velázquez valle	Externo	INIFAP		
Colaborador:					
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Rocío de Jesús Díaz Aguilar	Maestría	41111527		
Programa Docente:	Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre			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:

Sinergismo de tres especies de *Bacillus* para el manejo de hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del chile.

75,000

2.- Introducción

En México el chile (*Capsicum annum* L.) se cultiva en más de 153,500 ha, Zacatecas es el estado con mayor producción de chile seco con el 57% de la producción nacional, ocupando alrededor de 28,000 ha. (Velásquez y Medina, 2003). Es importante el cultivo por el valor que aporta a la producción agrícola nacional, además genera ingresos para los productores y ayuda en la creación de empleos (SIAP, 2010).

Una problemática fitosanitaria muy aguda desde hace varias décadas que sufre el cultivo de chile es la marchitez de las plantas. (Hernández, *et al*, 2013). Las pérdidas ocasionadas varían del 40% al 100% el daño se manifiesta en bajo rendimiento y disminución de la calidad, y con ello un costo elevado de inversión por el alto número de aplicaciones de productos químicos. (Macías, *et al*, 2010). Se ha asociado esta problemática a diferentes microorganismos como *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria spp* (Albañil, *et al*, 2015).

Como consecuencia, algunas regiones productoras importantes han disminuido su superficie de siembra o la producción se ha desplazado a nuevas áreas (Guigón y González, 2001).

Se ha señalado al hongo *Phytophthora capsici* L como el único agente causal de la Secadera o Marchitez de las plantas de chile, existen algunos estudios que han indicado que otros hongos fitopatógenos comúnmente aislados de raíces enfermas de plantas de chile, pudieran estar involucrados en la producción del síndrome de la enfermedad (Velásquez, Medina y Luna 2001).

Las especies de *Bacillus* antagonistas son una alternativa para el control de fitopatógenos, causantes de enfermedades en cultivos como el chile (Mejía, 2016).

Objetivos

- Identificar taxonómicamente a los hongos fitopatógenos asociados a la enfermedad
- Evaluar in vitro el antagonismo individual y en mezclas de especies del genero *Bacillus* sobre fitopatógenos asociados a la marchitez del chile.
- Realizar pruebas de patogenicidad en invernadero
- Pruebas de efectividad biológica in vitro

Hipótesis

Las combinaciones entre cepas de *Bacillus* serán significativos en el control de los patógenos asociados a la secadera del chile.

3.-Revisión de Literatura

El problema fitosanitario causado por hongos más importante en el cultivo de chile es la marchitez del chile (González-Chavira *et al*, 2015). Esta se ha extendido en nuevas plantaciones y diferentes zonas productoras de México la problemática principal a la que se enfrentan los productores es la dificultad en el control de la enfermedad (Mojica-Marín *et al*, 2009).

A nivel mundial se considera que la marchitez del chile es causada principalmente por *Phytophthora capsici* Leo. Sin embargo también hay otros patógenos involucrados: los hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* Schlechtend, *Verticillium spp*. (Alfonso, 2009).

La infección se presenta en las raíces o en la base del tallo; los órganos de la planta al ser afectados muestran una pudrición suave, acuosa e inodora, y tejidos de color pardo oscuro (INIFAP, 2010)

Los frutos afectados se quedan adheridos a la planta y en muchas ocasiones las semillas se pudren y contienen

micelio sobre ellas (INIFAP, 2008)

Los agricultores utilizan indiscriminadamente productos químicos con el consecuente aumento en los costos de producción y pérdidas económicas que conducen al abandono del cultivo (Lozano-Alejo *et al*, 2014). Las aplicaciones de fungicidas en la mayoría de los casos no son suficientes para el control de la enfermedad si las condiciones son favorables para el desarrollo de esta, por lo cual se buscan nuevas alternativas de control (Akgül y Mirik, 2008).

Las bacterias rizosfera son excelentes agentes para controlar patógenos vegetales en el suelo (Basha y Ulaganathan, 2002). Además algunas cepas de bacterias tienen la capacidad de solubilizar fósforo, fijar nitrógeno y producir auxinas favoreciendo al desarrollo de las plantas (Badía *et al*, 2011)

Las bacterias del género *Bacillus* son las más estudiadas de los grupos bacterianos como biocontroladores. *Bacillus* tiene la capacidad de producir moléculas bioactivas que tienen una fuerte capacidad antibiótica y antifúngica (Sarti y Miyazaki, 2013). El control biológico se realiza por medio de metabolitos inhibidores de hongos fitopatógenos; este mecanismo de acción se conoce como antibiosis, se basa en la producción metabólica de moléculas tóxicas volátiles y enzimas hidrolíticas, como son quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas (Basurto, 2010)

Recientemente, *B. pumilus* también ha sido reportado como el segundo *Bacillus* más predominante. Esta bacteria es altamente resistente a condiciones ambientales extremas tales como bajo o ningún nutriente, irradiación, y sustancias químicas. El papel ecológico de *B. pumilus* es importante por el hecho de que producen compuestos antagonistas de patógenos fúngicos y bacterianos (Ammini *et al*, 2009)

Bacillus subtilis, produce una gran cantidad de lipopeptidos, metabolitos primarios o secundarios, con amplio espectro antibióticos, estos metabolitos son supresores de algunos fitopatógenos por ejemplo *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria*, y *Verticillium*. (Ariza y Sánchez, 2012)

4.- Procedimiento Experimental

Localización del experimento

Se realizara en el departamento de parasitología agrícola en los laboratorios de Fitopatología y Microbiología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

De las muestras colectadas de plantas de chile con síntomas me marchitez los hongos fitopatógenos fueron aislados e identificados para posteriormente realizar:

- Pruebas de efectividad biológica *in vitro*: Las pruebas se realizaran por confrontación dual, para ello se utilizarán cepas de *Bacillus pumilus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* las cepas antagonicas serán proporcionadas por el departamento de Parasitología Agrícola.

En primer lugar se realizara la confrontación del hongo fitopatógeno con cada una de las cepas de *Bacillus* para luego realizar una mezcla de ellas con arreglo factorial de AxB para realizar de nuevo la confrontación, la siembra de *Bacillus* será en puntos equidistantes con respecto al hongo, se incubaran a 28°C y la toma de datos se realizara cada 24 horas (Ezziyyani *et al.*, 2004)

- Pruebas de patogenicidad: Se realizara en invernadero y se utilizaran semillas de chile serrano posteriormente cuando las plantas tengan de 3 a 4 hojas verdaderas serán trasplantadas e inoculadas con los hongos aislados con una solución de (1x10⁵) esporas o conidias según sea el patógeno. Las evaluaciones se realizarán cada 2 días durante 30 días, las variables a evaluar serán incidencia y severidad de la marchitez, los parámetros agronómicos a evaluar serán altura de planta, longitud de raíz, peso seco de raíz (Lozano, 2014)

- Análisis de resultados: mediante un Análisis de varianza (ANVA) y Pruebas de comparación de medias según Tukey ($p < 0.05$) se utilizara el programa estadístico SAS 9.0

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pruebas de patogenicidad de efectividad biológica <i>in vitro</i>	x	x	x									
Pruebas de patogenicidad				x	x	x	x	x				
Análisis de resultados								x	x	x		
Escritura de tesis y artículo	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pruebas de patogenicidad de efectividad biológica <i>in vitro</i>	35%											
Pruebas de patogenicidad				35%								
Envío de artículo científico								15%				
congreso										15%		

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2017	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Artículo científico
- Asistencia a un congreso
- Examen de grado

6.-Literatura Citada

1. Akgül DS and Mirik, M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Plant Pathology* 90:29-34.
2. Albañil Juárez José Alejandro, Luis Antonio Mariscal Amaro, Talina Olivia Martínez Martínez, José Luis Anaya López, Hugo César Cisneros López y Hugo Armando Pérez Ramírez. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc. Pub. Esp.* Núm. 11.
3. Ammini Parvathi; Kiran Krishna; Jiya Jose; Neetha Joseph; Santha Nair. 2009. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:269-275 ISSN 1517-8382.
4. Ariza Yesid y Sánchez Ligia. 2011. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas - Issn: 1794-2470 - Vol. 10 No. 18
5. Badia, Marcia M. Rojas, Hernández, Berto Tejera, Murrel, Jeny A. Larrea, Mahillon, Jacques, Pérez Mayra Heydrich. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)
6. Basha, S. y K. Ulaganathan. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science* 82: 1457-1463.
7. Basurto, M. G.; M. I. Font; J. García; M. Vásquez. 2010. Cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*. *Acta Microscopica* Vol. 19, No. 2, pp. 138 – 144.
8. Ezziyani Mohammed, Consuelo Pérez Sánchez, Ahmed Sid Ahmed, María Emilia Requena & María Emilia Candela. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
9. González Chavira M M, E. Villordo-Pineda, I. Torres-Pacheco, F. Delgadillo- Sánchez, R. Rodríguez-Guerra, S.H. Guzmán-Maldonado, J.L. Pons - Hernández. 2016. BUSQUEDA DE GENOTIPOS RESISTENTES A PATOGENOS DE RAIZ CAUSANTES DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annum* L.). Unidad de Biotecnología. Campo Experimental Bajío, Centro de Investigación Regional del Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Guanajuato.

10. Guigón, L.C. y P.A. González (2001). Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 49-56.
11. Hernández Castillo FD, RH Lira-Saldivar, G Gallegos-Morales, M Hernández-Suárez, S Solis-Gaona. 2014. Biocontrol de la marchitez del chile con tres especies de *Bacillus* y su efecto en el crecimiento y rendimiento. FYTON ISSN 0031 9457 (2014) 83: 49-55.
12. INIFAP. 2008. PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL CHILE (*Capsicum annum* L.). Folleto Técnico Núm. 15.
13. INIFAP. 2010. NUEVA TECNOLOGÍA DE MANEJO PARA EL CONTROL DE LA MARCHITEZ DEL CHILE EN AGUASCALIENTES. Publicación Especial Núm. 38. ISBN: 978-607-425-332-0.
14. Lozano Alejo Nanci, Remigio A. Guzmán-Plazola, Emma Zavaleta Mejía, Víctor Heber Aguilar Rincón, Victoria Ayala Escobar. 2014. Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 31-53.
15. Mejía-Bautista Miguel A, Jairo Cristóbal-Alejo, José M. Tun-Suárez, Arturo Reyes-Ramírez. 2016. Actividad in vitro de *Bacillus spp.* en la inhibición de crecimiento micelial de *fusarium equiseti* y *fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agrociencia 50: 1123-1135.
16. Mojica-Marín V, HA Luna-Olvera, CF Sandoval-Coronado, B Pereyra-Alfárez, LH Morales-Ramos, NA González-Aguilar, CE Hernández-Luna, OG Alvarado-Gómez. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. FYTON ISSN 0031 9457, (2009) 78: 105-110.
17. Sarti, G., C y S. S. Miyazaki. 2013. Actividad anti fúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. Agrociencia 47: 373-383.
18. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2010. Un panorama del cultivo del chile. Revista.
19. Vásquez López Alfonso, Bertha Tlapal Bolaños, M. de Jesús Yáñez Morales, Rafael Pérez Pacheco y Manuel Quintos Escalante. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 32 (2): 127 - 134.
20. Velásquez, V.R., A.M.M. Medina y R.J.J. Luna (2001). Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 175-181
21. Velásquez-Valle Rodolfo y María Mercedes Medina Aguilar. 2003. Patogenicidad de Aislamientos de *Rhizoctonia spp.* sobre Plántulas de Chile (*Capsicum annuum* L.) y Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 21, núm. 1,