



## Aislamiento y caracterización de hongos con propiedades de biocontrol sobre *Phytophthora capsici* L. en el estado de Zacatecas

Montzerrat Betzabé Muñoz-Medina | Saúl Fraire-Velázquez | Víctor E. Balderas-Hernández  
 Unidad Académica de Ciencias Biológicas | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: [balderas.victor@gmail.com](mailto:balderas.victor@gmail.com)

### Resumen

En el estado de Zacatecas el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es una de sus principales actividades socioeconómicas. Sin embargo, el cultivo es afectado por diferentes agentes patógenos, tales como *Phytophthora capsici* L. Este oomiceto es el agente causal de la destructiva enfermedad marchitez o secadera de la planta de chile, que causa enormes pérdidas de las áreas cultivadas. Una alternativa económica y amigable con el ambiente al uso de fungicidas es el uso de agentes de biocontrol (bacterias y hongos). El objetivo del presente trabajo fue realizar el aislamiento de hongos nativos de la entidad con actividad antagonica contra *P. capsici* L. y la evaluación del efecto protector en planta de *C. annuum* L. Se obtuvieron cultivos puros de hongos a partir de suelos agrícolas y derivados de la minería y de plantas asociadas a ellos (rizósfera, hojas y raíces), todos colectados en el estado. Se confrontaron 50 cepas de hongos contra *P. capsici* L. para obtener cinéticas de crecimiento-inhibición; 20 cepas causaron inhibición del crecimiento de *P. capsici* L. del 75 al 100%. La co-inoculación de plántulas de *C. annuum* L. con *P. capsici* L. y con cepas seleccionadas de hongos con características de biocontrol resultó en una notable reducción de síntomas de secadera en comparación con las plántulas infectadas únicamente con el fitopatógeno. Los resultados anteriores demuestran que los aislados fúngicos con actividad de biocontrol son agentes potenciales para protección de plantas de chile contra la enfermedad de la secadera.

*Palabras clave:* chile, secadera, *Phytophthora capsici*, biocontrol, hongos antagonistas.

## Introducción

En el estado de Zacatecas el cultivo de chile (*Cap-sicum annuum* L.) es una de sus principales actividades socioeconómicas. En el periodo 2010-2012 se produjeron 309 612 toneladas de chile, con un valor de producción de 2.16 billones de pesos en promedio (SAGARPA, SIAP). Sin embargo, el cultivo de chile enfrenta varios retos, como el riesgo de infección por diferentes micro-organismos patógenos, como *Phytophthora capsici* L., causante de la enfermedad conocida como de marchitez o secadera, que ha llegado a afectar de 60 a 100% la superficie cultivada (Delgadillo *et al.*, 2009). El oomiceto infecta la raíz o la base del tallo de planta de chile, lo que provoca pudrición y un estrangulamiento en la base del tallo que bloquea el xilema e interrumpe el paso de nutrientes y agua, lo que causa la marchitez de las hojas y conlleva a una defoliación, pudrición del fruto y muerte de la planta (Velásquez *et al.*, 2004; Hausbeck y Lamour, 2004).

Para el control de fitopatógenos se aplican grandes cantidades de fungicidas, que además de ser inespecíficos y costosos, provocan el desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno y problemas de contaminación y toxicidad al ecosistema (Rodríguez, 2002). Una alternativa al uso de fungicidas es el uso de bacterias y hongos como agentes de biocontrol, los cuales ejercen su efecto antagónico contra los hongos patógenos por medio de competencia de espacio o nutrientes, producción de metabolitos, parasitismo directo e incluso inducir la resistencia en plata (Balvatin *et al.*, 2009). Con lo anterior se hace necesaria la búsqueda de agentes de biocontrol (hongos) como opción para disminuir la pérdida de cultivos de chile por afección de *P. capsici* L.

El objetivo de este trabajo fue el aislamiento y la caracterización de cepas de hongos autóctonos del estado de Zacatecas, la evaluación de su efecto antagónico contra el crecimiento de *P. capsici* L. y la determinación de la capacidad de las cepas de hon-

gos seleccionados para proteger plántulas de *C. annuum* L. de la enfermedad causada por *P. capsici* L.

## Metodología

### Sitios de colecta de muestras

Se colectaron las muestras en los municipios de Guadalupe, Ojocaliente, Vetagrande y Sombrerete. Los sitios de colecta se eligieron tomando en cuenta si eran tierras destinadas al cultivo (de chile, alfalfa o maíz) o sitios derivados de procesos mineros posiblemente contaminados con metales pesados. También se tomaron muestras de rizósfera de plantas silvestres de los sitios de colecta de raíz, tallo y hojas; asimismo se colectaron muestras de cuerpos de agua y lodos. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico tipo ziploc para su transporte al laboratorio.

### Procesamiento de muestras, obtención y preservación de las cepas de microorganismo

Las muestras sólidas (10 g sólidos) se resuspendieron en solución salina (NaCl 0.85%). Del sobrenadante se seleccionaron las alícuotas necesarias para hacer diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ . Posteriormente, se tomaron 100  $\mu$ L de cada dilución y se sembraron en placas de medio papa dextrosa agar (PDA), suplementado con 400  $\mu$ g/mL de kanamicina y 250  $\mu$ g/mL de estreptomycin, para el aislamiento de hongos. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C, hasta que se presentó desarrollo de colonias de microorganismos (3 a 5 días). Con las diferentes cepas de hongos obtenidos se realizaron resiembras hasta obtener cultivos con morfologías únicas en medio PDA. A partir de los hongos aislados se realizaron cultivos líquidos en medio caldo papa dextrosa y se prepararon stocks de glicerol para la preservación del hongo a -80 °C.

## Evaluación del efecto antagónico de las cepas de hongos aislados contra *P. capsici* L.

En cajas Petri de 5.3 cm con medio PDA se colocó en un extremo la cepa de hongo aislada y en el lado contrario a *P. capsici* L., con ayuda de un sacabocados de 0.5 cm de diámetro; las cajas Petri se incubaron a 28 °C. El desarrollo de los hongos se evaluó midiendo el crecimiento radial de las colonias de los hongos hacia el centro de la caja, las mediciones se realizaron cada 24 h por ocho días. Se tuvieron como controles el crecimiento de *P. capsici* L. y el de cada cepa de hongo aislado. Cada confrontación y control se realizó por triplicado. De cada cinética de crecimiento se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de *P. capsici* L. que cada cepa de hongo causó.

## Evaluación del efecto de biocontrol en plántula de chile *in vitro*

Las semillas de *C. annuum* L. pasaron por un proceso de lavado y estratificado, después se colocaron en cajas Petri con medio Agar-Agua 1%, se dejaron en oscuridad por dos semanas, después se colocaron en cámara de fotoperiodo (16 h luz, 8 h oscuridad). Las plántulas con dos semanas de post-germinación se sembraron en medio Murashige & Skoog (MS) 40%, sin sacarosa, pH=5.8, 4 plántulas por caja. Para el caso de las confrontaciones, entre cada plántula sembrada se colocó un inóculo de 0.5 cm de diámetro de la cepa del hongo aislado alternado con un inóculo de 0.5 cm de diámetro de *P. capsici* L. Se incluyeron los controles solamente con el inóculo de las cepas de hongos aislados o bien de *P. capsici* L. Se evaluaron los daños que ocasionaron los hongos a la plántula durante quince días.

## Resultados y discusión

### Aislamiento de cepas de bacterias y de hongos

A partir del procesamiento de las distintas muestras colectadas a lo largo del estado de Zacatecas se obtuvieron 724 cepas de hongos. De ellas se tienen cultivos puros almacenados a -80 °C.

### Efecto antagónico de las cepas de hongos aislados contra *P. capsici* L.

Del total de las cepas de hongos obtenidas, 50 cepas de hongos se confrontaron con el agente patógeno *P. capsici* L. en medio PDA. El fitopatógeno *P. capsici* L. cultivado en medio PDA presentó micelio blanco algodonoso y crecimiento radial que cubrió la totalidad de la superficie de la placa en ocho días (datos no incluidos). Del total de las 50 cepas de hongos confrontadas con el fitopatógeno, 23 cepas de hongos inhibieron de 75 a 100% el desarrollo de *P. capsici* L. El hongo aislado M7-3, el cual se obtuvo a partir de suelo destinado al cultivo de chile en el municipio de Trancoso, ocasionó un 86% de inhibición en el desarrollo del hongo patógeno (figura 1a).

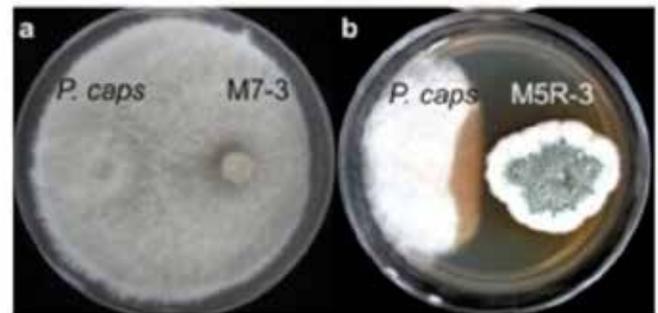


Figura 1. Confrontación de *P. capsici* L. con la cepa de hongo (a) M7-3 y (b) la cepa de hongo M5R-3. Tercer día de incubación a 28 °C en medio PDA.

En la cinética de crecimiento se puede observar que a las 72 h la cepa del hongo M7-3 presentó el máximo crecimiento, cubriendo por completo la superficie de la placa, evitando con ello el crecimiento

de *P. capsici* L. (figura 2), el cual no se restableció en los siguientes días de evaluación.

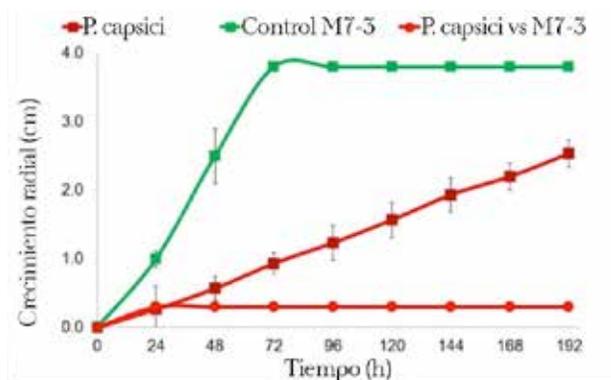


Figura 2. Cinéticas de crecimiento de *Phytophthora capsici* ■, cepa de hongo M7-3 ■, y crecimiento de *P. capsici* en confrontación con M7-3 ●.

Para el caso de la cepa de hongo M5R-3 (figura 1b), la cual fue aislada a partir de la raíz de una planta silvestre (no identificada) en el municipio de Sombrerete, causó un 68% de inhibición en el crecimiento de *P. capsici* L. La cepa M5R-3 impidió el desarrollo de *P. capsici* L. a las 48 h de iniciada la confrontación, como se puede observar en la figura 3.

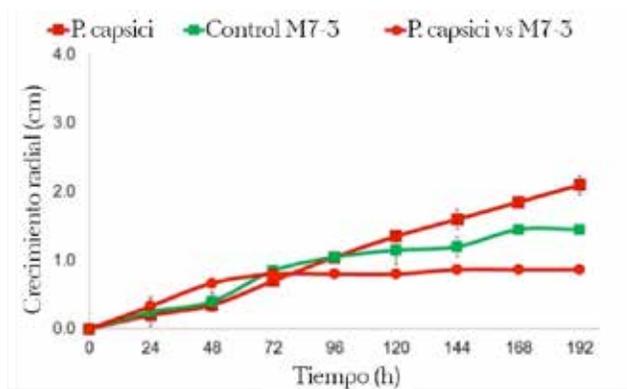


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de *Phytophthora capsici* ■, cepa de hongo M5R-3 ■, y crecimiento de *P. capsici* en confrontación con M5R-3 ●.

## Evaluación del efecto de biocontrol en plántula de chile *in vitro*

En primera instancia se determinó el grado de afectación que causa el fitopatógeno *P. capsici* L. en plántulas de chile, para ello las plántulas se infectaron con un inóculo de 0.5 cm de diámetro de *P. capsici* L. Al quinto día posterior a la inoculación, se observó la presencia de pudrición (manchas café) en tallo y en hojas, que fueron progresando hasta cubrir por completo a la plántula, a los quince días de post-inoculación las plántulas estaban completamente secas, sin turgencia y con defoliación (figura 2a).

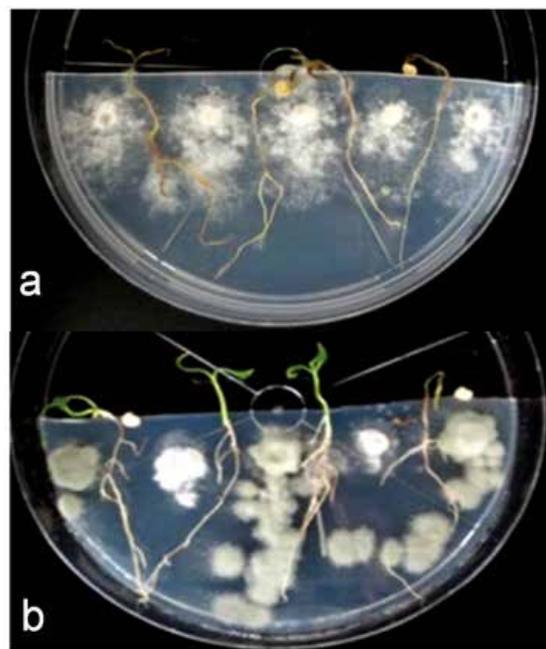


Figura 2. Plántulas de *C. annuum* (a) inoculadas con *P. capsici* L. (b) inoculadas con la cepa de hongo M5R-3 y con *P. capsici* L., con días de inoculación en medio ms 10%.

Concerniente a las plántulas de chile co-inoculadas con *P. capsici* L. y con el hongo M5R-3, las plántulas de chile mantuvieron su coloración verde y su turgencia (figura 2b) aún a los quince días post-inoculación, observándose notablemente la disminución de los síntomas de marchitez anteriormente vistos en el cultivo control infectado con el fitopatógeno (figura 2a).

## Conclusiones

Se aislaron cepas de hongos con diferente grado de inhibición del crecimiento de *P. capsici* L., las cuales podrían ser utilizadas como agentes de biocontrol para prevenir la enfermedad de secadera en plántulas de *C. annuum* L.

## Agradecimientos

A los apoyos obtenidos del FORDECYT-Doctores-174509 y del Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC-Promep-UAZ-PTC-189.

## Referencias

- Balvantín, G.C., Martínez, H.J.L., Cerda, R.F., Lira, S.R.H. (2009). Biotecnología en el control de microorganismos fitopatógenos. *Ciencia cierta*, 19:6.
- Delgadillo, S.F., Paredes, M.R., Godoy, H.H., González, C.M.M., Villondo, P.E., Pons, H.J., Anaya, L.J., Gámez, V.F., Mectina, C.T., Rodríguez, G.R. (2009). *Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato*. Guadalajara: Prometeo.
- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88(12): 1292-1303.
- Rodríguez, V. (2002). *Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprófitos contra Rhizoctonia solani, un fitopatógeno causante del (damping off) en plantas de tomate* (Tesis). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Velásquez, V.R.M., Medina, A.M.M., Luna, R.J.J. (2004). 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(2): 175-181.