



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Biocontrol del patógeno *Phytophthora capsici*, por la
interacción de Hongos Micorrízicos Arbusculares y
Azospirillum en plantas de chile**

TESIS

Que como requisito para obtener el título de:

**Maestro en Ciencias en Conservación y Manejo de los
Recursos Naturales**

Presenta:

ESPERANZA GRETA LEÓN PIÑA

Directora de tesis:

Dra. Yazmín Carreón Abud

Morelia Michoacán, Febrero del 2008

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL **LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA** DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DE LA **DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD.**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, que por medio de la Facultad de Biología me dieron la oportunidad de una formación profesional.

Al la División de Estudios de Posgrado en el Programa de Maestría en Conservación y Manejo de los Recursos Naturales.

A mi asesora Dra. Yazmín Carreón Abud por la confianza brindada para la realización de este proyecto, por su apoyo incondicional en todos los aspectos.

A la Dra. Sylvia Fernández Pavía por su apoyo en la realización de la inoculación del patógeno, por su tiempo y valiosas sugerencias.

A los integrantes de la comisión revisora: Dr. Miguel Martínez Trujillo, Dra. Yazmín Carreón Abud, Dra. Sylvia Fernández Pavía, M.C. Juan Carlos González Cortés por la revisión, los comentarios, recomendaciones y por su valioso tiempo.

Al Laboratorio de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología, por el apoyo en la realización del presente trabajo, a todos mis compañeros Nuria, Ricardo y Gloria por su apoyo en el laboratorio, en especial a Yazmín Martínez Carreón por sus comentarios.

A mis profesores de la maestría por sus conocimientos.

A mis compañeros de la Maestría: Rita, Daniel, Iris por su buena compañía durante los cursos y salidas de campo.

A todas aquellas personas que colaboraron de una u otra forma para la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

In Memoriam

Manuel León Rojas

*Por que cuando estuviste fuíste todo para mí
y ahora de una manera o de otra lo sigues siendo.*



A mí Madre Ma. Eugenia Piña Vázquez por darme las bases de mi vida y enseñarme la responsabilidad en el trabajo. A mis hermanas Heather, Edwige, Tere por acompañarme a lo largo de mi vida, por aguantarme y a mis sobrinos Danikha, Emilio, Paulina y Galia sólo por existir, son la luz de mi vida.

A mis amigos, Víctor por estar conmigo cuando más lo necesitaba y ahora no me lo quito de encima, Irene por ser siempre mi amiga y a su familia, Lucy por su apoyo y por que siempre tiene algo que decir, que hace que despierte, Oscar por su imborrable presencia, Gabee por ser mi equipo, Rocío por que a pesar del tiempo, seguimos siendo muy buenas amigas, Asdrúbal por tener la particularidad de hacerme sentir bien, A Elia por su amistad y apoyo incondicional, A Abel por compartir sus conocimientos, al equipo Shapes, a Selene, Alberto, Perla, Pavka, Jimmy, Ernesto Chef, Ernesto Pacheco, al Antrobiótica de todos los jueves y a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE CUADROS	vii
I. RESUMEN GENERAL	viii
II. SUMMARY	x
III. INTRODUCCIÓN	1
IV. ANTECEDENTES	2
1. Plantas de Chile (<i>Capsicum annuum</i> L.)	2
1.1.1 Plantas de Chile (<i>Capsicum annuum</i> L.)	2
1.1.2 Posición taxonómica	3
2. Marchitez de Chile ocasionada por <i>Phytophthora capsici</i>	3
2.1 <i>Phytophthora capsici</i>	5
2.2 Taxonomía de <i>Phytophthora capsici</i>	7
2.3 Ciclo biológico	7
2.4 Métodos de control del patógeno	9

3. Control Biológico	10
3.1 Alternativas para el Control Biológico	10
4. <i>Azospirillum</i>	11
4.1 Características generales	11
4.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal como componentes del Control Biológico.	12
4.3 Interacciones entre HMA y Bacterias.	13
4.3.1 Mecanismos moleculares de protección.	13
5. Hongos Micorrízicos Arbusculares.	14
5.1 Características generales	14
5.2 Principales estructuras de los HMA	17
5.3 Posición taxonómica	20
5.4 Los HMA como componentes de control biológico	21
5.6 Interacción de las micorrizas arbusculares con microorganismos rizosféricos implicados en control biológico	23
5.7 Mecanismos implicados en la bioprotección ejercida por las micorrizas arbusculares	24
V. HIPÓTESIS	28

VI. OBJETIVOS	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares	29
VII. RESULTADOS	30
CAPÍTULO 1.	
Resumen	30
Abstract	32
Introducción	34
Materiales y Métodos	36
Diseño experimental	36
Preparación e inoculación del patógeno	38
Evaluación de las variables agronómicas	40
Tinción de raíces	41
Determinación del porcentaje de colonización	42
Determinación de concentración de fósforo	42
Análisis estadístico	42

Resultados y discusión	43
Tamaño de la parte aérea	43
Tamaño de la raíz	45
Peso seco de la parte aérea	47
Peso seco de la raíz	49
Porcentaje de colonización micorrízica	51
Asimilación del fósforo	54
Conclusiones	55
Literatura citada	56
CAPÍTULO 2	58
Resumen	58
Abstract	60
Introducción	62
Materiales y métodos	64
Material biológico	64
Propagación de plantas de Chile	65
Inoculación micorrízica y de la bacteria <i>Azospirillum</i>	66
Preparación del inóculo de <i>Phytophthora capsici</i>	67
Inoculación con <i>Phytophthora capsici</i>	68

Conteo de zoosporas	69
Monitoreo de la severidad de la enfermedad y análisis	70
Tinción de raíces con azul de tripano	71
Análisis estadístico	72
Resultados y discusión	73
Peso seco de la parte aérea	73
Peso seco de la raíz	74
Colonización micorrízica	76
Inoculación de <i>Phytophthora capsici</i>	78
Incidencia de la enfermedad	80
Conclusiones	83
Literatura citada	84
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	86
IX. CONCLUSIONES GENERALES	90
X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	91
ANEXO 1	98

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Plantas de Chile <i>Capsicum annuum</i> L.	3
FIGURA 2 Marchitez del Chile	5
FIGURA 3. Colonia de <i>Phytophthora</i>	6
FIGURA 4. Ciclo biológico de <i>Phytophthora capsici</i>	8
FIGURA 5. Esporangios de <i>Phytophthora capsici</i>	9
FIGURA 6. <i>Azospirillum</i>	13
FIGURA 7. Estructuras de la micorriza	19
CAPÍTULO 1	
FIGURA I.1 Tamaño de la parte aérea en ausencia del patógeno	44
FIGURA I.2 Tamaño de la parte aérea en presencia del patógeno	44
FIGURA I.3 Tamaño de la raíz en ausencia del patógeno	46
FIGURA I.4 Tamaño de la raíz en presencia del patógeno	46
FIGURA I.5 Peso seco de la parte aérea en ausencia del patógeno	47
FIGURA I.6 Peso seco de la parte aérea en presencia del patógeno	48
FIGURA I.7 Peso seco de la raíz en ausencia del patógeno	50
FIGURA I.8 Peso seco de la raíz en presencia del patógeno	50
FIGURA I.9 Colonización micorrízica en ausencia del patógeno	52
FIGURA I. 10 Colonización micorrízica en presencia del patógeno	52
FIGURA I.11 Raíces de plantas de Chile <i>Capsicum annuum</i> L. teñidas con azul de tripano	53
FIGURA I.12 Concentración de fósforo	54

CAPÍTULO 2

FIGURA II. 1	Germinación de semillas en suelo estéril	65
FIGURA II. 2	Consortio de HMA y sustrato de la bacteria <i>Azospirillum</i>	66
FIGURA II. 3	Inoculación del patógeno <i>Phytophthora capsici</i>	68
FIGURA II. 4	Zoosporas y esporangios de <i>P. capsici</i> en raíces de plantas de Chile teñidas con Rosa de Bengala	69
FIGURA II.5	Severidad de la enfermedad observada en plantas de Chile	70
FIGURA II.6	Peso seco de la parte aérea de plantas de Chile en presencia de <i>P. capsici</i>	74
FIGURA II.7	Peso seco de la raíz de plantas de Chile en presencia de <i>P. capsici</i>	76
FIGURA II.8	Colonización micorrizica en presencia del patógeno <i>P. capsici</i>	77
FIGURA II.9	Tratamientos de la inoculación de 1000 zoosporas por planta	78
FIGURA II.10	Tratamientos de la inoculación de 500 zoosporas por planta	79
FIGURA II. 11	Porcentaje de plantas infectadas a los 100 días de tratamiento	81
FIGURA II. 12	Porcentaje de plantas infectadas a los 120 días de tratamiento	82

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.	Clasificación de los hongos formadores de micorriza	20
CUADRO I.1	Composición de sustrato para los tratamientos	36
CUADRO II.1	Tratamientos evaluados en el experimento	64
ANEXO 1		69

I. RESUMEN GENERAL

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la interacción de los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y la bacteria *Azospirillum* en el control del patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de Chile *Capsicum annuum* L. var. tampiqueña.

Se realizaron ensayos en condiciones de invernadero para evaluar el impacto de la colonización de HMA en plantas de Chile, en 8 tratamientos con 8 repeticiones cada uno. Las plantas se sembraron en suelo estéril y arena en proporción 3:1. El inóculo de HMA se obtuvo de plantas trampa de un consorcio de *Glomus* TIR1 adicionando 20 g por maceta. El inóculo de la bacteria fue *Azospirillum brasilense* de la cual se adicionó 4 g por planta. El inóculo de *Phytophthora capsici* se obtuvo por el procedimiento de Ristaino. La inoculación de las plantas se realizó 50 días después, de acuerdo al método de Oelke y Bosland, inoculando un total de 1000 zoosporas para el primer experimento y 500 zoosporas para el segundo experimento por planta de los tratamientos: Control, HMA, *Azospirillum* e Interacción HMA y *Azospirillum*. Se realizaron cosechas periódicas cada 20 días hasta los 120 días, evaluando las variables agronómicas, como tamaño de la parte aérea, tamaño de la raíz, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, colonización micorrízica e incidencia de la enfermedad.

La colonización micorrízica, mostró un aumento de 20% a 100% en presencia de *Phytophthora capsici* en el tratamiento de HMA en interacción con *Azospirillum*. Los resultados muestran que la presencia del patógeno estimuló el aumento de la colonización para conferir protección a las plantas.

El análisis de varianza ($p=0.05$), muestra que en las plantas tratadas con HMA en interacción con *Azospirillum* se redujo significativamente la presencia de zoosporas de *P. capsici*. La modificación de la arquitectura radical inducida por los HMA resultó en una menor severidad de la enfermedad, aunque no hay diferencias significativas en la raíz inducidas por la presencia del patógeno si hay diferencias en respuesta, se observa que las plantas de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña de ser susceptibles, pasan a ser tolerantes en presencia de los HMA. Los datos obtenidos muestran que la utilización de la micorriza arbuscular en interacción con *Azospirillum*, como agentes de biocontrol del patógeno *Phytophthora capsici* en las plantas de Chile, es eficiente.

II. SUMMARY

The objective of the present study was to determine the effect of the interaction between Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) with *Azospirillum* bacterium in the control of *Phytophthora capsici* pathogen in pepper plants (*Capsicum annuum* var. *tampiqueña*).

The experiment was performed under greenhouse conditions in order to evaluate the impact of colonization with AMF in pepper plants, in 8 treatments with 8 repetitions. The plants were grown on sterilized soil and sand in 3:1 proportion. The AMF inoculum was obtained from tramp plants adding 20 g to each plant. Four grams of *Azospirillum brasilense* were added.

The *Phytophthora capsici* inoculum was obtained by Ristaino procedure, this inoculation was carried out 50 days later, according to the Oelke & Bosland method, inoculating 1000 zoospores in the first experiment and 500 zoospores for the second experiment in each plant of the treatments: Control, AMF, *Azospirillum* and AMF in interaction with *Azospirillum*. Every 20 days periodic harvests were conducted up to 120 days, evaluate the agronomic variables, plant height, dry weight of aerial portion, roots length, dry weight of roots, percentage of mycorrhizal colonization and disease incidence.

The mycorrhizal colonization showed an increase from 20% to 100% in the presence of *Phytophthora capsici* in the treatment with AMF in interaction with *Azospirillum*. The results showed that the presence of the pathogen stimulated an increase of the mycorrhizal colonization to confer plant protection.

The variance analysis ($p=0.05$) showed that, on plants with interaction of AMF and *Azospirillum* the presence of zoospores of *P. capsici* was significantly reduced. The modification in the radical architecture induced by the AMF had an effect in the decrease of disease, although there were no significant differences in the root induced by the pathogen presence, there were differences in the response, we observed that the pepper plants (*Capsicum annuum* var *tampiqueña*) that are susceptible, turned out to be tolerant in the presence of AMF. The collected data showed that the use of arbuscular mycorrhizal in interaction with *Azospirillum* as a biocontrol agent of the *Phytophthora capsici* in pepper plants was efficient.

III. INTRODUCCION

En la actualidad se requiere del manejo de la agricultura desde un punto de vista sustentable. Esto implica el mantenimiento de la productividad sin deterioro del ambiente. Para la producción de hortalizas se requiere de la aplicación de agroquímicos, fertilizantes, fungicidas, insecticidas etc., que además de incrementar costos, deterioran el ambiente.

Una alternativa que permite disminuir la cantidad de agroquímicos utilizados para la producción de hortalizas es el control biológico utilizando microorganismos. Esta alternativa además de contribuir a la economía de los agricultores, permitirá la producción sin un grave deterioro del agroecosistema, manteniendo adecuadamente los recursos naturales.

Dentro de las interacciones que pueden beneficiar a las plantas se encuentran las que ocurren con microorganismos denominados agentes de biocontrol y biofertilizantes, de estos se distinguen algunos grupos, como: microorganismos fijadores de nitrógeno, hongos micorrízicos y las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas.

Por lo tanto el uso de herramientas biológicas que aseguren el establecimiento exitoso de especies vegetales, así como su mayor velocidad de crecimiento y de respuesta a eventos de competencia y perturbación juegan un papel importante.

La asociación micorrízica es de gran importancia en el establecimiento, supervivencia y crecimiento de plantas, debido a que pueden resultar en una alternativa viable para sustituir agroquímicos que son muy costosos y que sobre todo contaminan el ambiente.

IV. ANTECEDENTES

1. Plantas de Chile

1.1. Plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.)

El Chile es una de las hortalizas más utilizadas en México y a nivel mundial. Debido a la gran cantidad de tipos encontrados a lo largo de la República Mexicana que no están en otros lugares del mundo (Greenleaf, 1986), México es considerado como centro de origen del género *Capsicum* especie *C. annuum*.

El Chile, así como otras especies nativas de México no han recibido la atención debida. El Chile del género *Capsicum*, de la familia Solanácea, es uno de los cultivos originarios de Mesoamérica y está constituido por aproximadamente 30 especies que se distribuyen en las áreas tropical y subtropical de Mesoamérica y otros países del mundo (Fig 1).

Su contenido de vitaminas (vitamina C y pro vitamina A), y principalmente su sabor agradable y estimulante, de variedades dulces y picantes, así como su color, lo hacen un ingrediente valioso (Greenleaf, 1986). Los componentes pungentes en frutos *Capsicum* se conocen como capsicinoides (CAPS), y sus estructuras son vanilamidas con cadenas de ácidos grasos de 9 a 11 carbonos, los más abundantes de éstos son la capsicina y la dihidrocapsicina (Thomas *et al.*, 1998). La capsicina, es el más pungente de los capsicinoides aislados de Chile y junto con la dihidrocapsicina, constituyen del 80 al 90 % del total de los capsicinoides presentes en los frutos de *C. annuum* (Govindarajan & Sathyanarayana, 1991).

1.2 Posición taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*

Especie: *C. annuum*

Nombre común: Chile



Figura 1. Plantas de Chile *Capsicum annuum* L.

2. Marchitez del Chile ocasionada por *Phytophthora capsici*

Esta enfermedad provoca una muerte prematura de la planta, la infección ocurre en las raíces o en la base de tallo, especialmente en campos irrigados. El primer síntoma que se observa, es un marchitamiento de las hojas sin cambios en su color, las cuales finalmente quedan colgadas de los pecíolos. En la base del tallo aparece una mancha marrón verdusca, que se ennegrece de acuerdo con el grado de necrosis de los tejidos y lignificación de la planta. Las raíces y tallos afectados muestran una pudrición suave, acuosa e inodora (Fig 2).



Figura 2. Marchitez del chile (Tomado de http://www.vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/NewArticles/pepper_spanish.pdf)¹

Los frutos aceleran su cambio de color rojo y se arrugan. Los tallos continúan erguidos con las hojas colgantes y los frutos secos y arrugados. El síndrome se origina por la obstrucción de los haces vasculares (Avelar & Marban, 1989).

Los tejidos internos de la raíz y el tallo son pardo oscuros y las lesiones externas corresponden a cánceres hundidos que estrangulan el tallo en forma gradual. También el síndrome está asociado con la obstrucción de haces vasculares (González *et al.*, 2001).

Esta enfermedad se encuentra presente en todo el mundo. En México se le considera una de las enfermedades más importantes de este cultivo, se ha reportado la presencia de esta, en todos los estados productores de chile donde las condiciones ambientales favorecen el desarrollo, particularmente en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (Redondo, 1974; García *et al.*, 2000; Guijon & González, 2001). En condiciones favorables puede causar pérdidas económicas devastadoras al afectar del 60 al 100% de la superficie cultivada.

Actualmente existen en México regiones en donde se tienen pérdidas de hasta 80% y estados como Aguascalientes y San Luis Potosí, donde la superficie de siembra de Chile se ha reducido un 60% por causa de este problema.

En 2002 México ocupaba el segundo lugar en la producción de Chile fresco para 2002, pero repuntando en 2004 con 1 971 231 toneladas para ese año, (FAOSTAT, 2005).

2.1 *Phytophthora capsici*.

Las especies del género *Phytophthora* se han convertido en uno de los problemas más serios de la agricultura y de la producción de alimentos, causando enfermedades devastadoras en cientos de plantas hospederas.

Se encuentran taxonómicamente clasificados como oomicetes, generando esporas sexuales y asexuales con características que contribuyen al éxito de los patógenos. Estas esporas tienen estructuras de supervivencia, dispersión y propagación.

El surgimiento de estudios genéticos y moleculares en sistemas micológicos que comenzaron a mediados de 1900 se concentraron en hongos verdaderos no en oomicetes como *Phytophthora*. Hace algunas décadas se mostró que los oomicetes no pertenecen al reino de los hongos.

Una de las características que distinguen a los oomicetes de los hongos verdaderos es que los oomicetes son diploides y carecen de estados de vida libre haploide. Fue en 1990 cuando se comenzaron a desarrollar herramientas genéticas, las cuales mostraron aspectos de la biología de *Phytophthora* incluyendo el desarrollo de esporas. La mayoría de las esporas producidas por muchas especies de *Phytophthora* son asexuales y desarrollan una hifa especializada denominada esporangióforo. El esporangio asexual tiene la habilidad remarcable de germinar por dos vías diferentes, a altas temperaturas ($>14^{\circ}\text{C}$ para *P. infestans*), la germinación directa ocurre a través de aberturas en el hospedero como son los estomas, lenticelas o por heridas. La germinación indirecta también llamada zoosporogénesis es predominante a bajas temperaturas. Ambas vías de germinación requieren que el esporangio se encuentre inmerso en líquido y pueden ser inhibidas a altas concentraciones de esporas.

La germinación por zoosporas se cree que es la más importante en el desarrollo de la enfermedad, las zoosporas localizan el tejido del hospedero por varias vías, entre las que se involucran áreas de la raíz que son susceptibles a los patógenos (Judelson & Blanco, 2005) (Fig. 3).

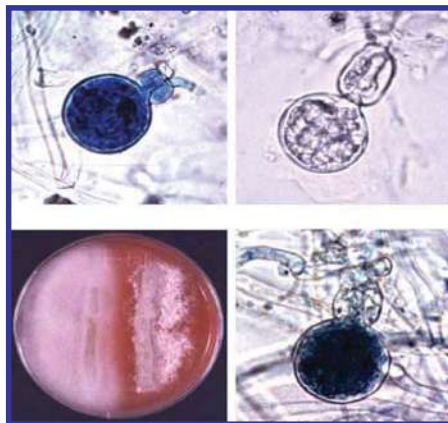


Figura 3. Colonia de *Phytophthora* (Tomado de Nature.Rev_Micro.pdf).

2.2 Posición taxonómica *Phytophthora capsici*

Reino: *Stramenipila*

Phyllum: *Oomycota*

Orden: *Peronosporales*

Familia: *Pythiaceae*

Genero: *Phytophthora*

Especie: *capsici*

(Leonian, 1972).

2.3 Ciclo biológico

Las oosporas son la única fuente de inóculo primario y sobreviven en el suelo por más de dos años en ausencia del hospedante. El micelio es una fuente importante de inóculo secundario (Romero & Anaya, 1998) (Fig 4). Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo son: alta humedad del suelo y temperaturas óptimas (entre 25°C y 30°C), en la última etapa del cultivo éste es más afectado, lo cual coincide con la etapa más lluviosa.

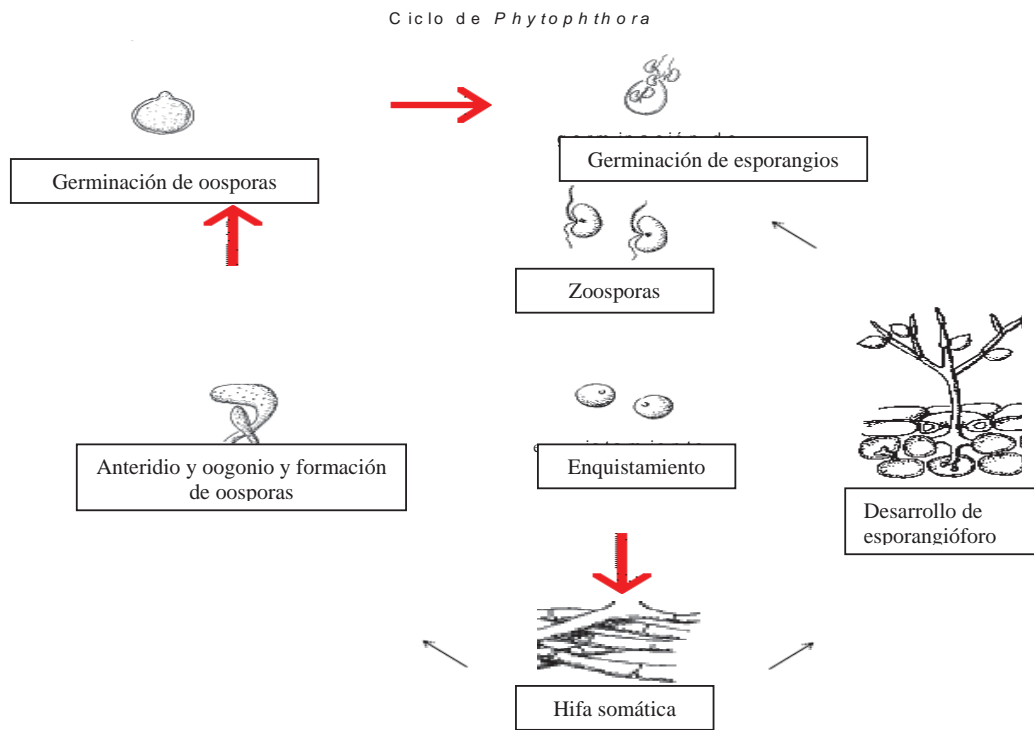


Figura 4. Ciclo biológico de *Phytophthora capsici* L.

La enfermedad se presenta generalmente después del transplante y cuando las lluvias y el mal drenaje permiten su desarrollo, las infecciones en el cuello de la planta son debidas a que las zoosporas del oomicete son llevadas por el agua e inician la infección por las heridas o estomas. Las lesiones de las ramas y las hojas son debidas a salpique del agua de lluvia. El patógeno sobrevive de una estación a otra en los residuos del tallo, los cuales liberan zoosporas que son acarreadas por el agua a otras plantas, el inóculo queda en residuos de cosechas como oosporas en las semillas atacadas o en el suelo como micelio u oosporas, que al ciclo siguiente germinan e infectan de nuevo (Mendoza & Pinto, 1983).

Siendo México centro de origen del Chile es factible que las fuentes de resistencia a esta enfermedad se encuentren en los materiales del Chile que están en contacto con el patógeno, principalmente en aquellos que han sido manipulados genéticamente por el hombre (González, 1999) (Fig. 5).



Figura 5. Esporangios de *Phytophthora capsici*
(Tomado de <http://www.web1.msue.msu.edu>) y Fernández P.S.

2.4 Métodos de control de patógeno

Es una enfermedad que se puede prevenir, pero su control resulta difícil. Este puede ser preventivo incluye cultivo en semilleros levantados para favorecer el drenaje; uso de plántulas y sustratos sanos; eliminación de tejidos de la cosecha anterior, especialmente las raíces y el cuello, manejo adecuado del riego; uso de la solarización, y realización de rotaciones regulares con cultivos como lechuga, repollo y cebollas.

Para controlar la enfermedad, se puede aplicar mefenoxam al plantar y de nuevo 30 y 60 días después de transplantar, mediante aspersión dirigida a la base de la planta. Pero el patógeno es tan agresivo que esta estrategia sólo funciona cuando la presión de la enfermedad es de baja a moderada. Además, se ha reportado que algunos aislamientos han desarrollado una resistencia a mefenoxam en algunas regiones productivas, siendo necesario el manejo integrado. Un estudio reciente de la Universidad de Nuevo México indica que la infección de *P. capsici* en la planta es favorecida por los niveles altos de salinidad en el suelo. Según éste reporte, la salinidad promueve el desarrollo de la enfermedad en plantas de Chile susceptibles a la misma. Los resultados sugieren que un manejo efectivo debería incluir la selección de variedades con tolerancia a la salinidad y resistencia a *P. capsici* (Vigo *et al.*, 2000).

3. Control Biológico

3.1 Alternativas para el control biológico

El control biológico se define como el manejo preciso y directo de los recursos biológicos para proteger a las plantas contra patógenos (Azcón-Aguilar *et al.*, 2002). El control de enfermedades mediante la aplicación de técnicas de biocontrol, es un área científica de gran interés por la necesidad de reducir la utilización de químicos en la agricultura y para promover significativamente la sustentabilidad mundial.

Entre estos organismos se encuentran los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), por su ubicuidad en ecosistemas naturales, terrestres y en la agricultura (Azcón *et al.*, 2002).

Este es un grupo económico de importancia ecológica; estos hongos simbióticos colonizan cerca del 80% de especies de plantas (Vigo *et al.*, 2000), incluso se documenta que del 90 al 95% de las plantas, mantienen algún tipo de asociación micorrízica (Smith & Read, 1997).

Estas micorrizas se pueden encontrar en casi todas las situaciones ecológicas, ambas en ecosistemas naturales, particularmente en comunidades de plantas con alta diversidad de especies e incluso de sistemas normales de cultivo, especialmente si se maneja con prácticas sustentables (Azcón *et al.*, 2002).

Algunos mecanismos diferentes explican el biocontrol de los HMA incluyendo cambios en el estatus de nutrientes, cambios bioquímicos en tejido de plantas, cambios anatómicos en células, alivio de estrés, cambios microbianos en la rizósfera y cambios en la morfología de la raíz (Vigo *et al.*, 2000).

4. Azospirillum

4.1 Características generales

Es un microorganismo común del suelo, especialmente abundante en la rizósfera de diversas plantas incluidas muchas forrajeras y gramíneas de importancia agrícola como el maíz y el sorgo.

Esta bacteria fija nitrógeno cuando la tensión de oxígeno es baja por lo cual es considerable su importancia económica en la agricultura (Stainer *et al.*, 1996).

4.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal como componentes de control biológico

Las bacterias promotoras de crecimiento, son aquellas que estimulan el desarrollo de la planta. Las bacterias pueden actuar de manera indirecta o directa. Los mecanismos indirectos, son los metabolitos producidos por las bacterias, pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucrando aspectos de control biológico, suprimiendo o inhibiendo el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta. Los mecanismos directos, ocurren cuando los metabolitos producidos, son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de estos de parte de la planta.

La conjunción de ambos mecanismos ha dado como resultado la promoción evidente de crecimiento de plantas, observando un crecimiento en emergencia, vigor y peso de plántulas, mayor desarrollo del sistema radicular, e incrementos hasta del 30% en la producción de cultivos de interés comercial. Este tipo de bacterias con efecto fungicida pueden representar una parte importante en el costo de la producción (Ocampo, 2001).

Varias especies de microorganismos han sido utilizadas en la práctica para incrementar la producción de algunos cultivos ya sea por su participación en el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas o por su capacidad para la fijación de nitrógeno atmosférico (Zhang *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que los cultivos puros de *Azospirillum* producen auxinas, citoquininas y sustancias similares a giberelinas, hormonas que participan en el desarrollo vegetal por lo tanto, el género *Azospirillum* pudiera resultar benéfico para estimular el desarrollo vegetal (Canto-Martín, 2004) (Fig.6).

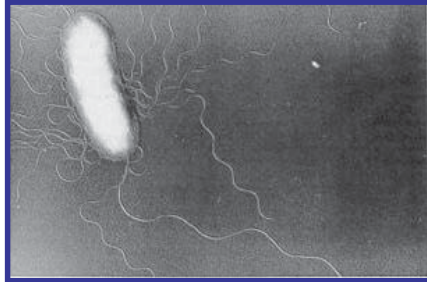


Figura 6. *Azospirillum* (Tomado de www.umn.edu/~microbio/.../A_brasilense.html).

4.3 Interacciones entre HMA y Bacterias

4.3.1 Mecanismos moleculares de ayuda

Por mucho tiempo la simbiosis micorrízica ha sido considerada como una relación bipartita, entre raíces de plantas y hongos micorrízicos. De cualquier modo, en condiciones naturales, las micorrizas están rodeadas por complejos de bacterias y comunidades de hongos, los cuales interactúan con la simbiosis micorrízica en plantas en diferentes niveles, físicos, metabólicos y funcionales. Esto, por que es mucho más relevante, hoy en día, el calificar raíces micorrizadas y asociadas a comunidades microbianas como un complejo micorrízico multitrófico.

Aunque es claro que los complejos micorrízicos juegan un rol mayor en producciones grandes y en el ciclo de nutrientes, la estructura y funcionamiento de estos complejos y particularmente la importancia de las interacciones entre bacterias y la simbiosis micorrízica, han sido pobremente estudiadas.

La especificidad del efecto de protección aparece dependiendo de las diferentes cepas de bacterias. El mecanismo principal en todos los estudios es el efecto directo de la bacteria protectora en la supervivencia presimbiótica y el crecimiento de los HMA en el suelo.

En paralelo a estos estudios, se debería poner atención a investigaciones de interacciones hongo-bacteria para el desarrollo de fines de protección de las plantas. Las interacciones entre bacterias ayudantes y hongos micorrízicos puede beneficiar otras investigaciones en otras áreas donde las interacciones hongo-bacteria jueguen un papel práctico y económicamente importante (Klett & Garbaye, 2005).

5. Hongos Micorrízicos Arbusculares

5.1 Características generales

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) forman parte integral de los diferentes tipos de vegetación. Se han encontrado en briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas participando en procesos de reciclaje de nutrientes y descomposición de la materia orgánica. Aproximadamente el 95 % de las especies vegetales viven en simbiosis con una gran cantidad de hongos del suelo (Azcón & Barea, 1992).

El término micorriza se deriva del vocablo griego y significa “hongo de raíz”. Los hongos micorrízicos establecen simbiosis mutualistas con la raíz de una planta hospedera. Estas asociaciones son usualmente benéficas para la planta hospedera así como para el microbionte (Mosse & Hayman, 1971). En dicha relación el hongo forma una red de hifas y facilita la captación de nutrientes (como P, Cu, Zn, N, Ca, S), por su parte, la planta aporta los compuestos orgánicos de la fotosíntesis (como carbohidratos).

En la asociación micorrízica, uno de los miembros (la planta) proporciona compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis, al otro miembro (el hongo). Por otro lado, los hongos obtienen agua y minerales esenciales del suelo que, después de pasar por los tejidos fúngicos, son incorporados a los tejidos de la planta. Existe por tanto, un movimiento bidireccional, simultáneo, selectivo, polar entre el hongo y la planta. Es selectivo porque sólo ciertas sustancias, no todo el contenido soluble de las hifas y de las células, parecen trasladarse. Es polar por que el carbono pasa de la planta hacia el hongo y los nutrimentos obtenidos del suelo, se transportan en dirección contraria (Koide, 1991).

Los HMA se encuentran en muchos cultivos avícolas, hortícolas, ornamentales y frutícolas, en la mayoría de los árboles de sombra y en forestales. Son abundantes de los trópicos hacia el ártico. En los árboles tropicales los hongos micorrízicos arbusculares son predominantes, dos posibles excepciones son las plantas que crecen en hábitats acuáticos y pantanosos.

Los HMA son simbiosiontes obligados y no pueden cultivarse fuera de las raíces vivas de las plantas, por lo que dependen totalmente de la planta fotosintética (Smith & Read, 1997). Sus esporas germinan en el suelo y colonizan las células corticales de la raíz de una planta hospedera.

Los HMA crecen dentro y fuera de las células vivas de las raíces formando vesículas y arbusculos dando una amplia gama de funciones y aplicaciones, lo cual les da la posición de fertilizantes biológicos (Azcón & Barea, 1996).

Otras acciones claves de las micorrizas han recibido menos atención. Sin embargo, es un hecho ampliamente aceptado que las micorrizas mejoran el enraizamiento de las plantas y su establecimiento en el suelo (Jeffries & Barea, 2001), facilitando el ciclado de nutrientes, incrementan la resistencia de las plantas a situaciones de estrés, tanto biótico, como abiótico.

En general la micorriza ayuda al crecimiento y desarrollo de las plantas; lo cual ha estimulado interés, ya que la micorriza incrementa el grado de absorción de varios nutrientes, así como de agua, incrementa la sanidad y longevidad de las raíces, incrementa la tolerancia a la sequía, a altas temperaturas del suelo, a la toxicidad por metales pesados, a pH extremos y al estrés del transplante (Powell, 1982; citado en Carreón, 2001).

En las últimas décadas se le ha dado especial importancia a los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA), particularmente a la micorriza arbuscular, con base en los efectos benéficos que estos micosimbiontes proveen a sus hospedantes; por lo que el manejo que tienen estos endófitos tiene uso potencial en los diferentes procesos de propagación de plantas. El manejo o establecimiento de la biotecnología que representan los HMA se debe realizar en las primeras fases del crecimiento y/o establecimiento de las plantas, de modo que reciban el mayor beneficio previamente a su explotación.

El beneficio que aporta la simbiosis micorrizica a las plantas está determinado por la actividad de micelio externo del hongo, ya que este posee mayor capacidad de absorción de los nutrientes del suelo mediante la extensa red de hifas que el hongo pueda generar. De este modo, la actividad del micelio coadyuva en la función de la raíz sobre todo cuando ésta ha agotado los nutrientes de la zona del suelo adyacente.

5.2 Principales estructuras de los HMA.

Redes de hifas

Peyronel (1923) describió un desarrollo extensivo del micelio que unía plantas entre sí. La primera investigación sistemática del micelio extrarradical, asociada con raíces de pastos en hábitats naturales fue Harley en 1991, quien describió una variación en el diámetro de 2-27 μm entre fragmentos de hifas con variaciones en su grosor (Olivares & Barea, 1991). (Fig 7).

Micelio externo

El hongo inicia un crecimiento extensivo para colonizar el suelo que rodea la raíz. Algunas hifas se desarrollan a lo largo de la superficie de ésta y producen puntos de colonización “secundarios”.

La red tridimensional del micelio externo tiene dos tipos de hifas: unas de pared gruesa (20-30 μm de diámetro) sobre la que forman las vesículas externas y esporas de resistencia que constituyen la base permanente del micelio y otras de pared más fina (2-7 μm) efímeras y con funciones de absorción de nutrientes. Las dimensiones del micelio externo están condicionadas por el hongo, la planta y el medio (Olivares & Barea, 1991).

Arbúsculos.

Los arbúsculos tienen generalmente un promedio de vida corta. La vida media de un arbúsculo es de 4 a 10 días (Cox & Tinker 1976, citado en Olivares & Barea, 1991). Su proceso degenerativo comienza por una desorganización del citoplasma en las ramas más finas, la textura se torna amorfa y los organelos indistinguibles (Bonfante-Fasolo, 1994 citado en Olivares & Barea, 1991).

Los arbúsculos son estructuras de intercambio de nutrientes mediante las cuales tiene lugar el metabolismo simbiótico entre el hongo y la planta.

Vesículas

Las vesículas son orgánulos de reserva que en este caso no causan cambios en la forma de la raíz y dañan el tejido vascular de las plantas. Las vesículas se desarrollan posteriores a los arbúsculos, en las regiones más antiguas de la infección y contienen material lipídico, por lo cual se las ha aceptado comúnmente como orgánulos de almacenamiento de algunos de los HMA. Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado (Olivares & Barea, 1991).

Esporas

Las esporas son estructuras redondeadas con paredes muy finas y resistentes, presentan una gran cantidad de núcleos y son estructuras de supervivencia, capaces de dispersarse por el aire y agua. El número de esporas en los suelos, es variable ya que depende de la composición de especies, viabilidad, latencia, etc. Las esporas se definen como la mejor fuente de inóculo de HMA y es la estructura más importante, la cual puede ser utilizada para la identificación de la especie, con cierto grado de confianza.

La densidad de las esporas en el suelo es muy variable y se relaciona con la extensión o el grado de colonización, ambos se incrementan en la estación de crecimiento de las plantas anuales (Carreón, 2001) (Fig 7).

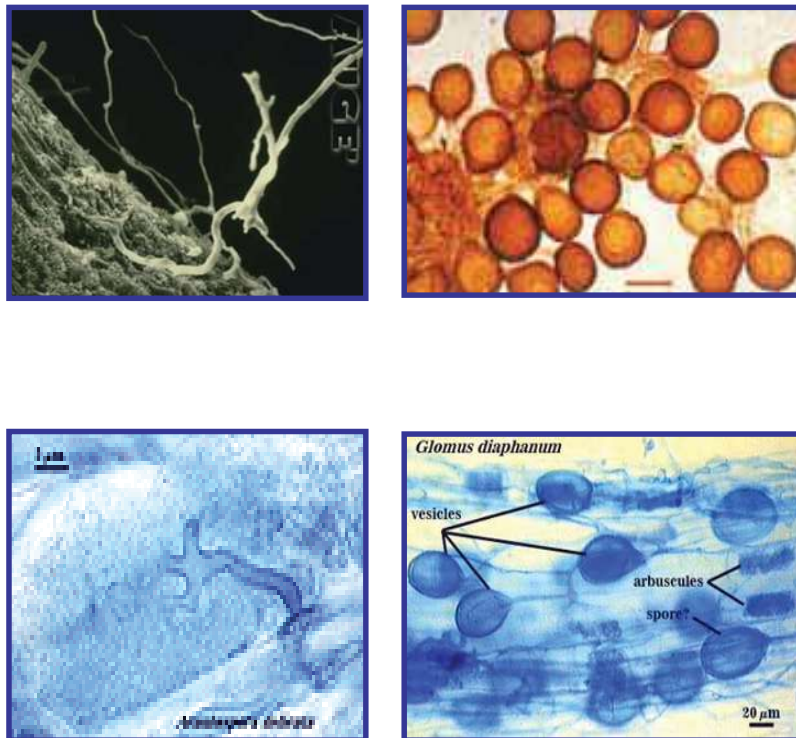


Figura 7. Estructuras de la micorriza (Tomado de <http://www.mycorrhiza.ag.utk.edu/>).

5.3 Posición taxonómica

La última clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos fue presentada por Schüßler *et al.*, 2001, tal y como se muestra en el Cuadro 1.

Dominio	<i>Eukaryota</i> Eucariotas
Reino	Fungi (Linnaeus, 1753) Nees, 1817
Phylum	<i>Glomeromycota</i> (C. Walker & Schüßler, 2001)
Clase	<i>Glomeromycetes</i> Cavalier-Smith, 1998
Orden	<i>Paraglomerales</i> C. Walker & Schüßler, 2001 <i>Archaeosporales</i> C. Walker & Schüßler, 2001 <i>Diversisporales</i> C. Walker & Schüßler, 2001 <i>Glomerales</i> Morton & Benny, 1990
Géneros	<i>Glomites</i> (Taylor <i>et al.</i> , 1995), <i>Paraglomus</i> (Morton & Redecker, 2001), <i>Archaeospora</i> (Morton & Redecker, 2001), <i>Gigaspora</i> (Gerdemann & Trappe, 1973), <i>Scutellospora</i> (C. Walter F.E. Sanders, 1986), <i>Acaulospora</i> (Gerdemann & Trappe, 1973), <i>Entrophospora</i> (Ames & Schneider, 1979) y <i>Glomus</i> (Tulasne, 1884)

Cuadro 1. Clasificación de los Hongos formadores de micorriza de acuerdo con Schüßler *et al.*, 2001

5.4 Los HMA como componentes de control biológico

Son numerosos los mecanismos por los cuales la micorriza arbuscular protege a las plantas de los patógenos radicales. El efecto primario de la micorriza arbuscular en la tolerancia de enfermedades es a través del mejoramiento en la nutrición de fósforo; se ha visto que la sustitución de hongos micorrízicos por fertilizantes fosforados, produce la misma respuesta en el hospedante (Smith, 1988).

Aparentemente los HMA pueden afectar indirectamente las relaciones hospedero-patógeno, por la alteración fisiológica del hospedante. Por ejemplo, disminución de la permeabilidad de la membrana (Graham *et al.*, 1981, citado en Olivares & Barea, 1991), causada por un incremento en la nutrición que afecta la calidad y cantidad de exudados radicales (Schwab *et al.*, 1983), lo que repercute en la germinación de esporas y la penetración de los microorganismos en las raíces (Graham, 1982; Smith, 1988) citados en Olivares & Barea., 1991.

Los hongos micorrízicos pueden estar relacionados en la modificación de la resistencia del hospedante algunas alteraciones fisiológicas, cambios bioquímicos y morfológicos en la planta hospedante ya que diversas sustancias orgánicas se han encontrado en altas concentraciones en raíces micorrizadas, por ejemplo: ácido ascórbico, etileno, aminoácidos (arginina) y proteínas, polisacáridos insolubles acumulados en la pared celular, ligninas, enzimas con actividad quitinolítica, así como acumulación de fitoalexinas, isoflavonoides (gliceolina). Grantmaison, 1990 reporta un incremento en la cantidad de compuestos que pueden conferir resistencia a las raíces micorrizadas contra patógenos del suelo (citados en Olivares & Barea, 1991).

Los HMA tienen un mayor impacto en el sistema de arquitectura de la raíz, por la promoción del incremento de ramificaciones. Los cambios en la morfología del sistema de la raíz, pueden modificar la dinámica de la infección.

Otro factor es la competencia directa e indirecta entre microorganismos patógenos y HMA, se muestran actividades antagonistas contra patógenos de las plantas y consecuentemente pueden actuar sinérgicamente con los HMA en la protección de la planta.

Los HMA son capaces de contribuir en el control del patógeno en condiciones de laboratorio y de invernadero. Es necesario entonces evaluar la factibilidad de incluir a los HMA como tecnología de componente de estrategias de biocontrol en sistemas de producción. Todos los mecanismos involucrados en estos procesos no están completamente entendidos (Azcón *et al.*, 2002).

La protección ejercida por las micorrizas tampoco se expresa en todos los sustratos de crecimiento, ni bajo todas las condiciones ambientales. Es necesario por lo tanto estudiar en profundidad cuáles son las condiciones favorables para que se manifieste este efecto y lo que es aún más importante, los mecanismos que justifican y favorecen la existencia o no de bioprotección.

Sólo en base al conocimiento integrado de los distintos procesos y mecanismos implicados en la expresión de la protección se puede plantear la utilización de manera racional y previsible de las micorrizas arbusculares en el control biológico de los patógenos que afectan el sistema radical (Azcón- Aguilar *et al.*, 2004).

5.6 Interacción de las micorrizas arbusculares con microorganismos rizosféricos implicados en control biológico

Un hecho interesante desde el punto de vista de su posible explotación en protección vegetal es que la capacidad profiláctica de las micorrizas puede ser explotada en cooperación con la de otros microorganismos rizosféricos antagonistas de patógenos. Entre estos antagonistas se han estudiado ciertas rizobacterias (PGPR), como por ejemplo *Pseudomonas* y *Bacillus* y ciertos hongos como, *Trichoderma* y *Gliocladium*, que al tener la capacidad para controlar las poblaciones de otros microorganismos del suelo son útiles y están siendo empleados en el control biológico de patógenos.

Las rizobacterias implicadas en el control biológico actúan por mecanismos de diversa índole, entre los que se incluye cambios en las poblaciones de microorganismos en la rizosfera, producción de sideróforos, compuestos antibióticos, ácido cianhídrico, etc. (Dowling & O’Gara, 1994; Handelsman & Stabb, 1996), así como mediante competición por sitios de colonización o por compuestos carbonados. Además, ciertas rizobacterias son capaces de inducir resistencia sistémica (ISR) en plantas frente a patógenos (Leeman *et al.*, 1995; Ongena *et al.*, 1999), citados en Azcón-Aguilar *et al.*, (2004), lo que las convierte en una herramienta de gran utilidad en la prevención de enfermedades.

Podría existir el riesgo de que estas bacterias ejercieran un efecto negativo sobre los hongos micorrízicos y, consecuentemente, sobre el establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, hasta ahora no se han detectado tales efectos inhibidores sino, más bien al contrario, una acción sinérgica entre este tipo de bacterias, incluso cuando han sido manipuladas genéticamente para conseguir una mayor producción de sustancias antifúngicas y hongos micorrízicos (Barea *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1998).

En general los microorganismos antagonistas de hongos patógenos estudiados hasta la fecha en relación a su interacción con hongos micorrízicos, no muestran efectos negativos sobre estos. Así, por ejemplo, se han mostrado efectos sinérgicos de los hongos más frecuentemente empleados en control biológico por ser antagonistas de hongos micorrízicos (Linderman, 1992) y con *Trichoderma* (Calvet *et al.*, 1995), aunque también se ha descrito ausencia de efectos o incluso efectos inhibidores. La utilización de consorcios de microorganismos con actividad bioprotectora, y que no muestran efectos antagónicos entre ellos, es un área de gran potencial de aplicación cuyo desarrollo, tanto a nivel científico como tecnológico, contribuirá de forma decisiva a la sustentabilidad de los agrosistemas, (en Azcón-Aguilar *et al.*, 2004).

5.7 Mecanismos implicados en la bioprotección ejercida por las micorrizas arbusculares

El efecto protector frente a patógenos de la raíz conferida por los hongos micorrízicos es probablemente consecuencia de mecanismos distintos y que interactúan entre ellos. La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos va a estar condicionada por la combinación planta/ hongo micorrízico en cuestión y por las condiciones ambientales dominantes.

Entre los mecanismos descritos se incluyen algunos indirectos, derivados de la mejora en la nutrición mineral de la planta, la compensación de los daños producidos por el patógeno o la competición entre hongos micorrízicos y organismos patógenos por sustratos carbonados y/o sitios de infección/colonización (Azcón-Aguilar & Barea, 1996).

Todos estos son mecanismos de acción, derivados del propio funcionamiento de la simbiosis micorrízica, ya que es un hecho que las plantas con micorriza presentan normalmente un estado nutritivo más adecuado (lo que las faculta para defenderse mejor del ataque de un patógeno), una mayor superficie de absorción de nutrientes (debido al aporte extra que representa el micelio externo del hongo o de los hongos que colonizan la planta) y evidentemente, los hongos micorrízicos representan un factor importante de competencia para los organismos que se desarrollan en alguna etapa de su ciclo de vida en el sistema radical de la planta, puesto que éste ya está colonizado previamente por los hongos micorrízicos.

Además de estos mecanismos indirectos de acción, hay cada vez más evidencias experimentales de la implicación de otros mecanismos más específicos.

Estos podrían resumirse muy sucintamente como sigue:

- I) Inducción de cambios citológicos o histológicos en la raíz. Se han sugerido que se presentan en algunas ocasiones y pueden ir desde un incremento en la lignificación de las células de la endodermis, lo que dificultaría la penetración del patógeno hacia el cilindro vascular de la raíz (Dehne & Schönbeck, 1979). Hasta los cambios en las células epidérmicas que justifiquen el menor número de puntos de infección de *Phytophthora* sobre las raíces de las plantas con micorriza (Vigo *et al.*, 2000).

- II) Cambios en la arquitectura radical de la planta. Se sabe que se pueden producir estos cambios como consecuencia del desarrollo de las micorrizas (Atkinson *et al.*, 1994). Normalmente se produce un incremento en la ramificación del sistema radical, aunque en ocasiones se ha descrito lo contrario. Estos cambios podrían, de alguna forma, dificultar la penetración del patógeno, o bien desacoplar su ciclo de vida con el ritmo de producción de raíces.

- III) Las micorrizas pueden actuar indirectamente promoviendo cambios en la exudación radical de las plantas y, en consecuencia, sobre las poblaciones microbianas de la rizósfera (Azcón-Aguilar & Barea, 1992). Estos cambios se pueden producir en el sentido de favorecer el desarrollo de microorganismos antagonistas del patógeno que complementarían de esta forma la actividad protectora de las micorrizas (Barea, 1997; Fillion *et al.*, 1999) citados en Azcón–Aguilar *et al.*, (2004). También se han descrito disminuciones en el potencial infectivo del patógeno en la rizósfera de plantas con micorriza. Esto en algunas ocasiones se ha atribuido a la alteración de los exudados radicales de la planta como consecuencia de la colonización micorrizica (Norman & Hooker, 2000) o a un efecto antagonista directo del hongo micorrizico sobre el patógeno (St- Arnaud *et al.*, 1995) citados en Azcón–Aguilar *et al.*, (2004).

- IV) Por último, se ha postulado y comprobado muy recientemente la activación de los mecanismos de defensa de la planta hospedera como consecuencia de la colonización de la raíz por parte de los hongos micorrízicos, en la medida en que ocurre, aunque sea débilmente, determina una respuesta más rápida de la planta al ataque posterior de un patógeno y por tanto un cierto grado de bioprotección (Azcón-Aguilar & Barea, 1996).

En general se acepta que los HMA pueden jugar un papel importante en la protección de las plantas frente a patógenos que afectan a sistema radical y que probablemente están implicados en los fenómenos de supresión de patógenos que se producen de forma natural en muchos suelos. La explotación racional de este grupo de microorganismos en protección vegetal requiere, por un lado, una mejor comprensión de los mecanismos de acción y de los factores ambientales que favorecen su expresión, y por otro lado, del desarrollo de tecnologías apropiadas para la obtención y aplicación de inóculo eficaz. La combinación de estrategias de investigación básica aplicada es fundamental para diseñar protocolos de manejo adecuados, que faciliten su utilización de forma integrada con otros recursos naturales, con vistas al desarrollo sostenido de agrosistemas y ecosistemas forestales (Azcón-Aguilar *et al.*, 2004).

V. HIPÓTESIS

El uso de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) en interacción con la bacteria *Azospirillum* contribuyen al control biológico de *Phytophthora capsici* en plantas de Chile *Capsicum annuum* L.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la interacción de hongos micorrízicos arbusculares y la bacteria del género *Azospirillum* en el control de *Phytophthora capsici* en plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) en condiciones de invernadero.

Objetivos particulares

1. Evaluar la influencia de las interacciones de los microorganismos en el crecimiento y desarrollo de la planta de Chile *Capsicum annuum* L. en condiciones de invernadero (Variables agronómicas: Tamaño de la planta, tamaño de la raíz, peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz).
2. Evaluar la infectividad de los Hongos Micorrízicos Arbusculares en plantas de Chile *Capsicum annuum* L. (Porcentajes de colonización total de las raíces de las plantas crecidas bajo condiciones de invernadero).
3. Determinar la incidencia de la enfermedad y la sintomatología en plantas de Chile *Capsicum annuum* L. var. *tampiqueña* en presencia del patógeno *Phytophthora capsici*.
4. Analizar las concentraciones de fósforo en los tejidos de las plantas, en las interacciones en estudio.

VII. RESULTADOS

CAPITULO 1.

Influencia de los HMA y *Azospirillum* en el crecimiento y desarrollo de plantas de Chile *Capsicum annuum* L. en presencia de *Phytophthora capsici* L. bajo condiciones de invernadero.

RESUMEN

Se realizó un experimento en condiciones de invernadero con plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) variedad tampiqueña con el propósito de evaluar el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en interacción con la bacteria *Azospirillum* en presencia de *Phytophthora capsici*. Se utilizó un diseño experimental de 8 tratamientos en todas las posibles combinaciones completamente al azar. Las plantas fueron sembradas en una mezcla de suelo y arena estéril en proporción 3:1 respectivamente. Las plantas fueron inoculadas con HMA (TIR1) con 20 g por maceta y se adicionó 7 g de inóculo de bacteria *Azospirillum* en un sustrato. El inóculo de *Phytophthora capsici* se obtuvo por el procedimiento de Ristaino. La inoculación se realizó después de 50 días de tratamiento de acuerdo al método de Oelke & Bosland. Se evaluaron las siguientes variables cada 20 días hasta los 120 días: tamaño de la planta, peso seco de la parte aérea, tamaño de la raíz, peso seco de la raíz, porcentaje de colonización micorrízica.

Los resultados muestran que los HMA mejoran la resistencia al efecto de *Phytophthora capsici* debido a que no presentan reducción en el desarrollo de la parte aérea, además de que no se registra pérdida significativa en el peso de la raíz, por otra parte, los valores más bajos en altura de la planta y peso seco de la parte aérea se obtuvieron en los tratamientos que no presentan micorriza.

La interacción HMA con *Azospirillum* mostró valores similares a los tratamientos que sólo contenían HMA en la mayoría de las variables, pero estos últimos presentaron un mayor efecto en la tolerancia al patógeno *P. capsici*. La colonización micorrizica de las raíces mostró un aumento de hasta el 90% en ausencia del patógeno y en la interacción HMA con *Azospirillum* en presencia de *P. capsici*, mostró un aumento de hasta el 100% a los 120 días, lo cual demuestra que la presencia del patógeno *P. capsici* estimuló el aumento de la colonización por micorrizas para conferir protección a las plantas permitiendo así la aceleración de absorción de nutrientes de manera eficaz y favoreciendo el control biológico al disminuir los síntomas.

Palabras clave: Patógeno, colonización de raíces, control biológico.

Abstract

We conducted an experiment with pepper plants (*Capsicum annuum* L. var. *tampiqueña*) under greenhouse conditions, in order to evaluate the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) interacting with the bacterium *Azospirillum* in the presence of *Phytophthora capsici*. An experimental design completely randomized of 8 treatments with all possible combinations was used. Plants were grown in a mixture of sterilized soil and sand in proportion 3:1 respectively. Plants were inoculated with 20 g of AMF inoculum and 7g of *Azospirillum* substrate. *Phytophthora capsici* inoculum was obtained by Ristaino procedure, the inoculation was realized after 50 days of treatment following the method of Oelke & Bosland. The following variables were measured every 20 days up to the 120 days: plant height, dry weight of aerial portion, roots length, dry weight of roots and percentage of mycorrhizal colonization.

The results showed that the use of AMF improved the tolerance effect against *Phytophthora capsici*; the AMF treatments did not reduced development, the plants do not present effect on dry weight of aerial portion and the results did not show significantly loss of dry weight of roots. On the other hand, the lowest values in plant height and dry weight of aerial portion were obtained in the absence of AMF. Although in most of the variables there wasn't significant difference between the AMF treatments and AMF in interaction with *Azospirillum* and it was clear that the AMF treatments showed a high tolerance effect against *Phytophthora capsici*.

The roots colonization with mycorrhiza showed an increase up to 90 % without the presence of the pathogen and in the interaction with AMF and *Azospirillum* in the presence of *P. capsici*, the colonization increased up to 100% in 120 days, which demonstrates that the mycorrhizal stimulated the increase of mycorrhizal colonization to confer effective nutrient uptake and improved biological control reducing symptoms disease.

Key words: Pathogen, roots colonization, biological control.

Introducción

El control biológico puede definirse como el manejo directo y preciso de recursos biológicos, para proteger a las plantas contra patógenos. Algunos grupos de microorganismos son capaces de proteger a las plantas contra patógenos a través de la acción de varios mecanismos. Entre estos organismos, los hongos micorrízicos arbusculares resultan prometedores, el efecto exitoso de los hongos micorrízicos, particularmente la micorriza arbuscular, ha sido comprobado en varios cultivos y contra varios patógenos, incluyendo hongos, bacterias y nematodos.

Se ha reportado que la micorriza arbuscular tiene un efecto supresivo en las enfermedades causadas por un sinnúmero de hongos que infectan las raíces (Sharma y Gianinazzi, 1992). De hecho, ya importantes microorganismos patógenos de plantas como *Phytophthora capsici*, y *P. parasitica* han sido eficazmente biocontrolados por los hongos micorrízicos arbusculares (Azcón y Barea, 1996 citados en Vigo *et al.*, 2000).

Se han realizado estudios acerca del papel que tienen los Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como el potencial de estos en la protección de las plantas (Schönenbeck, Gruenewaldt-Stoecker & Von Alten, 1994). Las raíces inoculadas con HMA son química y físicamente diferentes, por lo que pueden resistir la infección de patógenos, debiendo destacar la infección contra la infección de *Phytophthora*, *Pythium* o *Fusarium* entre otros.

Se ha encontrado que la presencia de los HMA en los sistemas radiculares protege a la planta de varios tipos de estrés y enfermedades de la raíz ocasionadas por bacterias, nematodos y hongos (Mosse & Hayman, 1980; Rosendahl, Rosendahl & Thingstrup, 1992).

Los HMA no forman una barrera física, por lo cual la protección debe ser fisiológica, estimulando los mecanismos de defensa de la planta hospedera. Así mismo se piensa que el aumento en el vigor de las plantas con micorrizas las vuelve menos sensibles al estrés causado por la invasión de patógenos.

El efecto de los HMA sobre las enfermedades se describe como benéfico (Campbell, 1989) y de manera general, las plantas con micorrizas sufren menos daños y el desarrollo del patógeno se ve inhibido (Dehne, 1982). Comúnmente los HMA parecen no tener efectos o bien la acción puede ser indirecta e incrementar la lignificación de las raíces, previniendo la infección de patógenos. Los HMA generalmente necesitan haber sido preinoculados o haber infectado con anterioridad a la raíz para promover la protección de la misma (Campbell, 1989).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de las interacciones de los microorganismos en el crecimiento y desarrollo de la planta de Chile *Capsicum annuum* L. en condiciones de invernadero así como identificar el efecto de la infección de los HMA sobre las raíces y sobre el desarrollo del patógeno *Phytophthora capsici*.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

El experimento se desarrolló bajo condiciones de invernadero (30°C) utilizando plantas de Chile *Capsicum annuum* L. Se obtuvieron ocho tratamientos distribuidos en bloques completamente al azar con un total de 400 plantas. La combinación de los factores para evaluar originó 8 tratamientos, se tomaron 8 plantas por cada muestreo para su evaluación (Cuadro I.1).

	Tratamiento	Composición
1	Plantas Control	Suelo estéril y arena blanca (3:1)
2	Plantas con HMA	Suelo estéril y arena blanca (3:1), con inóculo de HMA (100 g)
3	Plantas con <i>Azospirillum</i>	Suelo estéril y arena blanca (3:1), con inóculo de <i>Azospirillum</i> (7 g)
4	Plantas con HMA + <i>Azospirillum</i>	Suelo estéril y arena blanca (3:1), con inóculo de HMA (100 g) y <i>Azospirillum</i> (7 g)
5	Plantas control + <i>Phytophthora capsici</i>	Suelo estéril y arena blanca (3:1), adicionando una suspensión de 500 zoosporas por ml de <i>P. capsici</i> a los 50 días
6	Plantas con HMA + <i>Phytophthora capsici</i>	Suelo estéril y arena blanca (3:1), con inóculo de HMA (100 g), adicionando una suspensión de 500 zoosporas por ml de <i>P. capsici</i> a los 50 días
7	Plantas con <i>Azospirillum</i> + <i>Phytophthora capsici</i>	Suelo estéril y arena blanca (3:1), con inóculo de <i>Azospirillum</i> (7 g), adicionando una suspensión de 500 zoosporas por ml de <i>P. capsici</i> a los 50 días
8	Plantas con HMA + <i>Azospirillum</i> + <i>Phytophthora capsici</i>	Suelo estéril y arena blanca (3:1), con inóculo de HMA (100g) y <i>Azospirillum</i> (7g), adicionando una suspensión de 500 zoosporas por ml de <i>P. capsici</i> a los 50 días

Cuadro I. 1. Composición del sustrato en los tratamientos evaluados.

El inóculo de HMA se extrajo de un suelo trampa, el inóculo de la bacteria *Azospirillum* fue obtenido de un sustrato y el patógeno *Phytophthora capsici* fue obtenido del asilado de una planta de Chile proporcionado por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.

Las semillas seleccionadas de Chile (*Capsicum annuum* L.) para germinar de la variedad tampiqueña, se esterilizaron en una solución de cloro al 5% durante 5 minutos, posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril (Carreón *et al.*, 2007). Se colocaron en un germinador utilizando un sustrato de suelo estéril y arena blanca estéril en proporción 3:1, con la finalidad de obtener plántulas para su trasplante en macetas con los diferentes tratamientos.

El inóculo que utilizamos para dichos tratamientos, fue de un cultivo trampa el cual se obtuvo del consorcio denominado TIR1, de especies *Glomus* conformado por: *Glomus invermaium* May, *Glomus mosseae* (Nicol & Ger) Gerd & Trappe, *Glomus aggregatum* Scheck & Smith y *Gigaspora* sp. *Aff. margarita* (Carreón & Martínez, 2003), proveniente de la localidad de Tiripetio Michoacán, el suelo se homogeneizó con el sistema radical y se utilizó como inóculo.

Preparación e inoculación del patógeno

La producción de esporangios y zoosporas se llevó a través del procedimiento de Ristaino 1990, el inóculo fue obtenido de un fruto infectado con el patógeno el cual fue proporcionado por la Dra. Sylvia Fernández Pavía del IIAF.

El inóculo de *Phytophthora capsici* se obtuvo por el aislamiento del patógeno de un fruto infectado. El cultivo puro de *Phytophthora capsici* fue desarrollado en medio V-8 clarificado agar a 27°C durante 5 a 7 días. Se sembraron 10 cajas para inocular 128 plantas de Chile *Capsicum annum* L. var. tampiqueña en los diferentes tratamientos. Posteriormente se indujo la esporulación cortando cuadros de micelio de 1 cm y se transfirieron a cajas de petri esterilizadas, a estas cajas se les agregó agua estéril y se incubaron a 27°C de 5 a 7 días.

Después de este tiempo fueron observadas para determinar si hubo la producción de esporangios en el microscopio, pero como la cantidad que se observó fue baja se extrajo el agua con una micropipeta estéril y se le agregó más agua (esto es para disminuir los nutrientes y que esto induzca la producción de esporangios) y se incubaron por más tiempo a la misma temperatura.

La inducción de la liberación de zoosporas se inició al colocar las cajas con esporangios a una temperatura de 4°C por un lapso de 30-60 minutos, después de este período, se dejaron por 15-20 minutos a temperatura ambiente y cuando el número de zoosporas fue abundante, las cuales fueron observadas con el microscopio, se preparó una suspensión de zoosporas. Se colocó el agua con zoosporas de todas las cajas en un vaso de precipitado, se tomó 1 ml de la suspensión y se colocó una gota de colorante para inmovilizar las zoosporas y poder hacer la cuantificación en ambos lados del hematocitómetro.

Las plantas de Chile *Capsicum annuum* L. var. tampiqueña, fueron inoculadas con una suspensión de 1000 zoosporas por ml, el patógeno fue inoculado a los 50 días de tratamiento después del trasplante siguiendo el método de Oelke & Bosland (2003).

Debido a que la variedad de Chile utilizada para esta investigación, resultó ser susceptible al daño ocasionado por el patógeno, se realizó una segunda inoculación siguiendo el mismo protocolo, reduciendo el número de zoosporas.

En el segundo experimento se inoculó una suspensión de 500 zoosporas por ml en cada una de las plantas.

Evaluación de variables agronómicas

Se realizaron cosechas periódicas de las plantas, con el objeto de evaluar las variables agronómicas. Las cosechas se tomaron a los 20, 40, 60, 80, 100 y 120 días aproximadamente.

Las raíces fueron lavadas con la finalidad de eliminar residuos del suelo, se midió la parte aérea y la raíz de cada planta, posteriormente se colocaron por separado en bolsas de papel y se metieron al horno a secar (80°C) durante dos días.

Las variables agronómicas que se obtuvieron cada 20 días, fueron:

Tamaño de la parte aérea.

Tamaño de la raíz.

Peso seco de la parte aérea.

Peso seco de la raíz.

Porcentaje de colonización micorrízica.

Concentración de fósforo en la parte aérea.

Tinción de raíces

El procedimiento de tinción de raíces se realizó con la técnica de Phillips & Hayman (1970) modificada por Walker 1997, citados en Carreón *et al.*, 2007.

Las raíces fueron tomadas al azar de cada uno de los tratamientos con HMA presentes, se lavaron cuidadosamente para remover las partículas de suelo que quedaron en ellas. Se colocaron en una solución de hidróxido de potasio al 10% y se calentaron a presión de 10 lb durante 10 min, se eliminaron los restos al lavar la muestra con agua destilada, posteriormente se cubrieron con HCl al 10% durante 3 o 4 minutos y entonces se eliminó la solución, estas raíces se enjuagaron ya que las muestras pueden acidificarse para la tinción. Se retiró el exceso de solución y se tiñeron con azul de tripano al 0.05% en lactoglicerol, calentándose a 10 lb de presión por 10 minutos, se retiró el colorante y se adicionó lactoglicerol limpio.

Estas raíces se colocaron en un portaobjetos y se observaron directamente al microscopio óptico 40x y 100x, identificando las estructuras de la micorriza, obteniendo el número de segmentos colonizados en cada una de las raíces, para obtener el porcentaje de colonización micorrízica (Carreón *et al.*, 2007).

Determinación del porcentaje de colonización.

Los tratamientos en los cuales se les realizó la tinción de raíces fueron los tratamientos 2, 4, 6 y 8 los cuales contienen los HMA y la interacción HMA con *Azospirillum*. Se montaron 10 segmentos de raíz de aproximadamente de 1 cm cada una en portaobjetos, se observaron al microscopio y se realizó el conteo en todas las raíces y en base al total de las raíces cuantificadas se estimó el porcentaje de colonización el cual se obtuvo cada 20 días de tratamiento, por medio de la fórmula de Phillips & Hayman (1970) citados en Carreón *et al*, 2007.

Determinación de concentración de fósforo

La cantidad de fósforo total en cada una de las plantas sometidas a los tratamientos establecidos en presencia del patógeno *P. capsici* a los 120 días se determinó mediante el método Vanadato Molibdato. El análisis fue realizado en el Centro de Estudios en Medio Ambiente (CEMA).

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos en este estudio se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey. El tratamiento estadístico se realizó utilizando el programa SPSS (10.0) para Windows.

Resultados y Discusión

Tamaño de la parte aérea

Los resultados de los diferentes tratamientos en ausencia del patógeno *Phytophthora capsici* en el caso del tamaño de la parte aérea mostraron un crecimiento similar, el análisis indicó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Fig I.1).

Para el caso del tamaño de la parte aérea en presencia del patógeno se observa el efecto de protección por parte de los HMA y la interacción HMA con la bacteria *Azospirillum* que a partir de los 80 días muestra un mayor crecimiento con respecto al control y con sólo la bacteria *Azospirillum* (Fig I. 2), esto muestra una ventaja en el tamaño. La presencia de los HMA impidió que la parte aérea resultara altamente afectada por la presencia de *P. capsici*

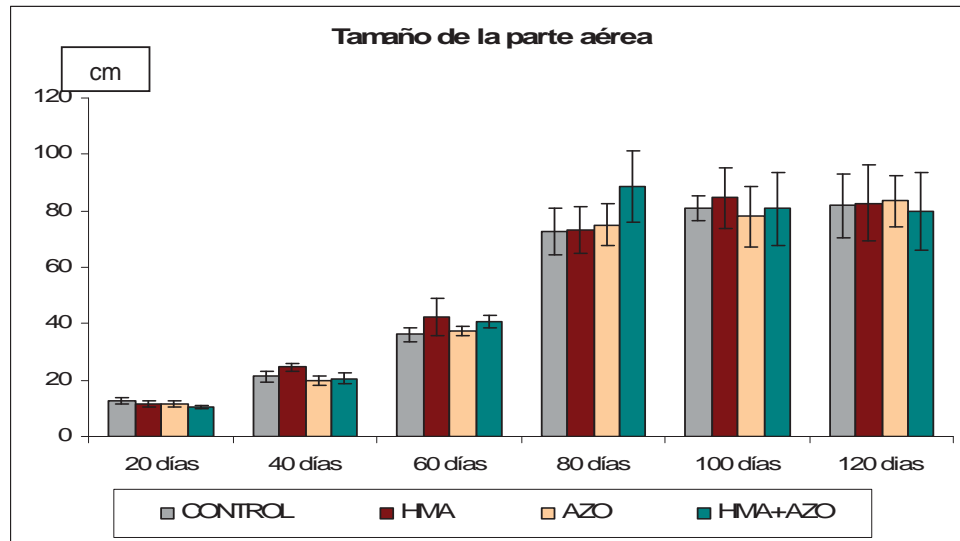


Fig I.1. Tamaño de la parte aérea en ausencia del patógeno.

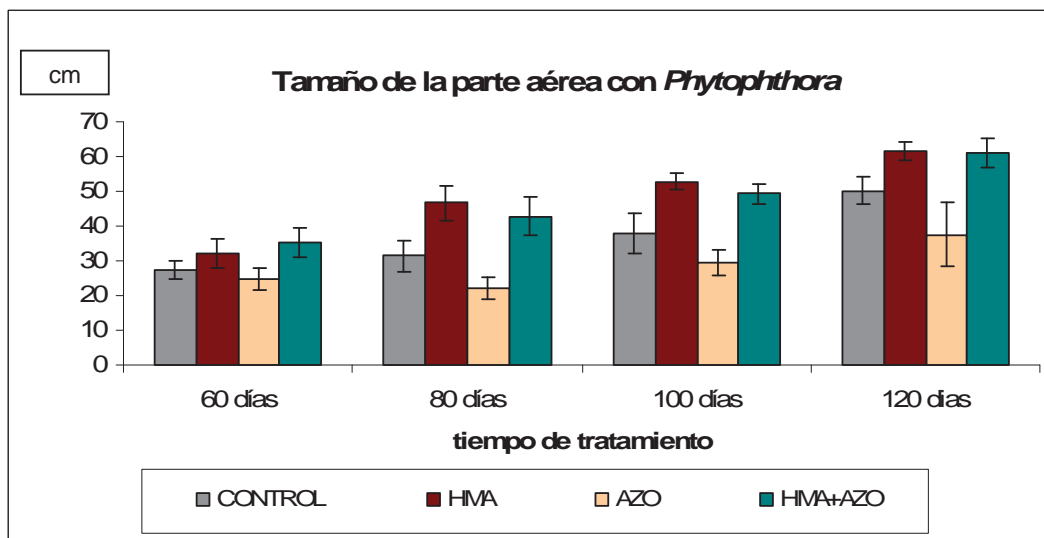


Fig I. 2. Tamaño de la parte aérea en presencia del patógeno.

Tamaño de la raíz

Para la variable de tamaño de la raíz en ausencia del patógeno, el crecimiento fue similar, hubo un mayor efecto a partir de los 80 días y a los 120 días observándose una diferencia entre los tratamientos con HMA y la interacción HMA con *Azospirillum* (Fig I. 3).

Se presentaron diferencias altamente significativas en los tratamientos con HMA y la interacción HMA con *Azospirillum* debido a la presencia del patógeno. En las plantas infectadas por el patógeno *P capsici*, la pérdida de raíz fue más notoria desde los 80 días de tratamiento. Las plantas con HMA y la interacción HMA con *Azospirillum* incrementaron sus valores a partir de los 80 días y así se mantuvo hasta el final del experimento (Fig I.4). De hecho es evidente el aumento en tamaño de la raíz debido a que no hubo pérdida de biomasa y las raíces no se vieron afectadas, incluso la raíz principal se presentó diferenciada de las raíces laterales, de ahí el aumento del tamaño.

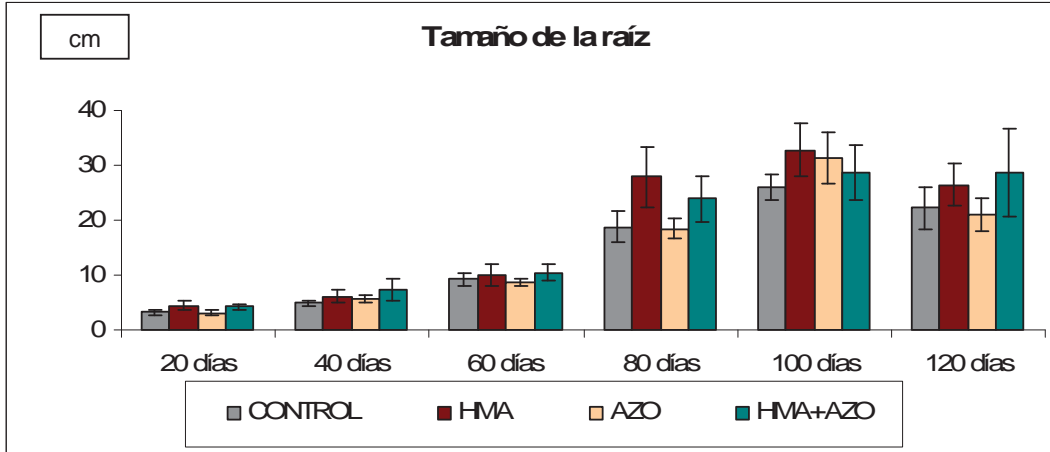


Fig I. 3. Tamaño de la raíz en ausencia del patógeno.

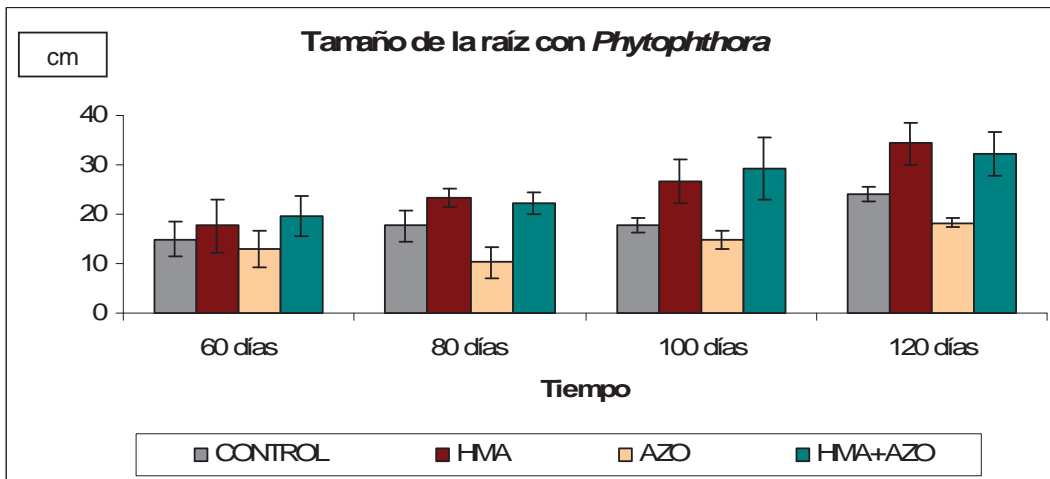


Fig I. 4. Tamaño de la raíz en presencia del patógeno.

Peso seco de la parte aérea

Con relación al peso seco de la parte aérea en ausencia del patógeno *Phytophthora capsici*, los tratamientos presentaron un comportamiento similar, a los 80 y 120 días, los factores HMA en interacción con *Azospirillum* y HMA respectivamente tuvieron un efecto benéfico (Fig I. 5).

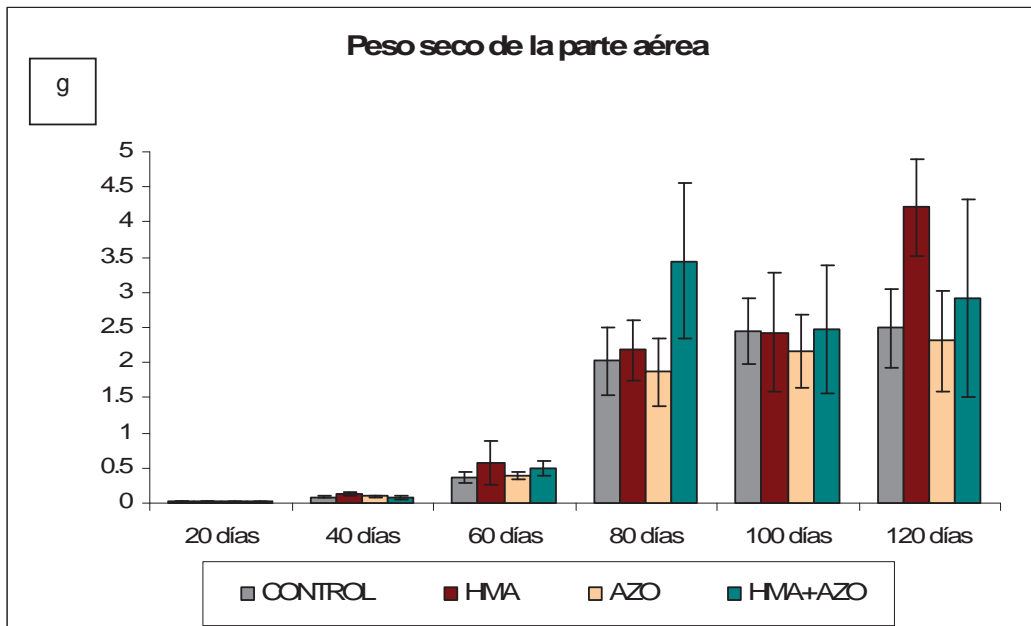


Fig I. 5. Peso seco de la parte aérea en ausencia del patógeno.

Respecto al peso seco de la parte aérea en presencia del patógeno *Phytophthora capsici*, los tratamientos con HMA mostraron la mayor diferencia observada para esta variable, la cual se atribuye a la presencia del patógeno y se observa que los HMA en interacción con la bacteria *Azospirillum* posiblemente no sean sinérgicamente benéficos para las plantas de Chile.

Desde los 80 días de tratamiento se observa que hubo una mayor biomasa de los tratamientos en presencia de los HMA con respecto a los demás tratamientos (Fig I. 6).

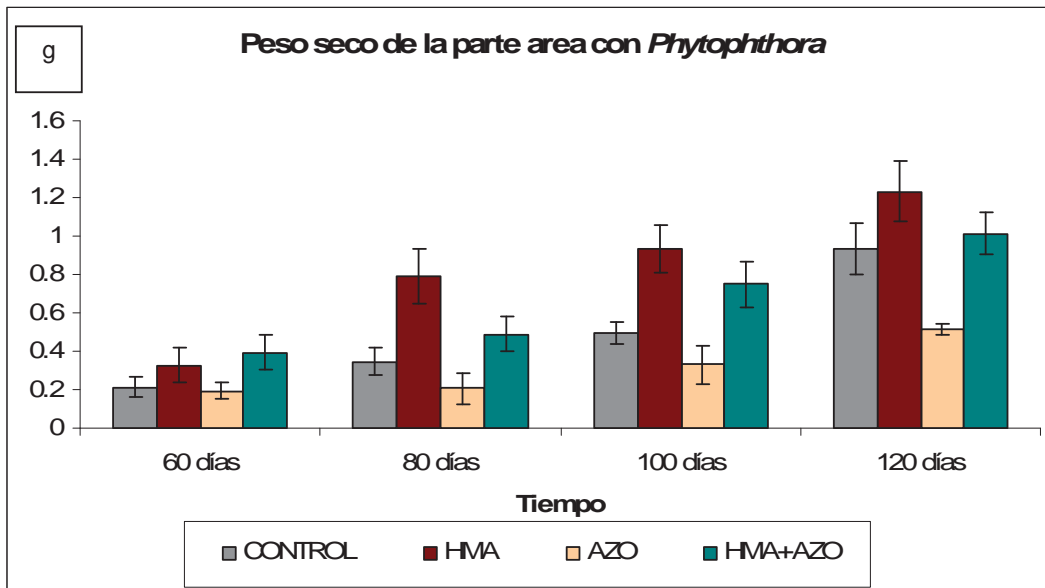


Fig I. 6. Peso seco de la parte aérea en presencia del patógeno

Peso seco de la raíz

Como se esperaba en relación al peso seco de la raíz, los tratamientos en ausencia del patógeno no mostraron diferencia significativa (Fig I.7).

Con relación al peso seco de la raíz en presencia del patógeno *Phytophthora capsici* no hubo pérdida significativa en la biomasa radical, incluso el tratamiento con HMA tuvo pesos similares, lo cual nos hace inferir que el tratamiento con HMA en interacción con la bacteria *Azospirillum* se vio influenciado por la interacción de otros microorganismos presentes, lo que indica que los HMA están tomando ventaja de la simbiosis al tomar los nutrientes de la planta en lugar de suplir a la planta con éstos.

Se mostró una pérdida significativa de las raíces en plantas infectadas con *P. capsici*. En general la presencia de los HMA permitió que el patógeno no afectará de una manera más severa a la planta ya que esta variedad es muy susceptible a este patógeno en específico.

A pesar de la presencia de los HMA, se presentaron valores de biomasa incluso ligeramente inferiores a los controles a los 120 días de tratamiento, en ausencia del patógeno *Phytophthora capsici*, a diferencia del mismo tratamiento en presencia del patógeno.

Por lo tanto es importante conocer al endófito específico de una planta hospedera individualmente, con el fin de obtener un incremento en el crecimiento de la planta y en la protección del sistema radicular, aunque este tratamiento fue el que menor daño sufrió por la presencia de *Phytophthora capsici* (Fig I. 8).

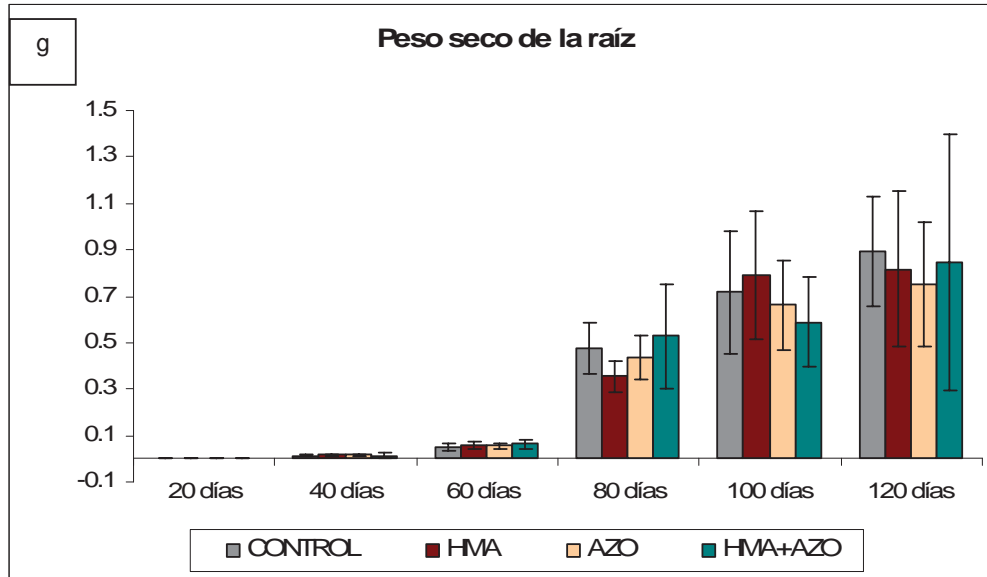


Fig I. 7. Peso seco de la raíz en ausencia del patógeno

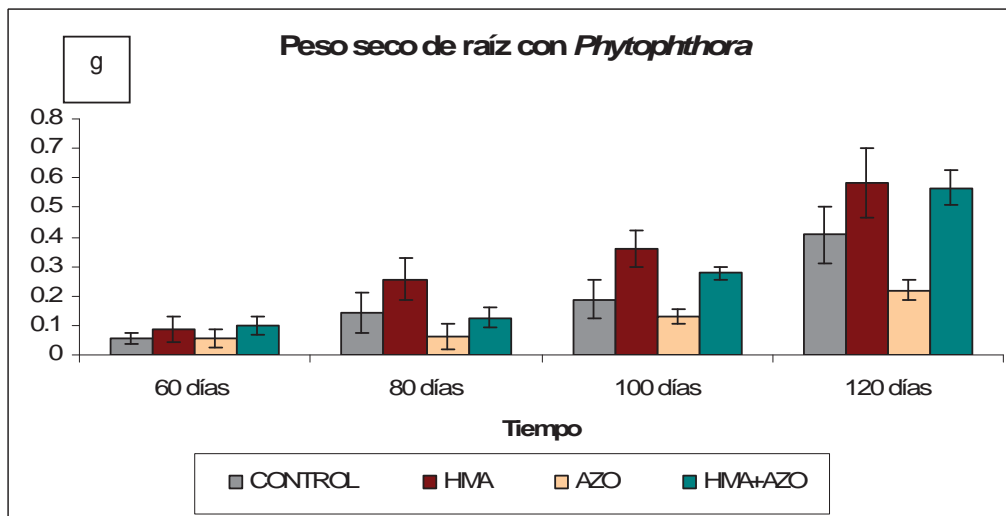


Fig I. 8. Peso seco de la raíz en presencia del patógeno

Porcentaje de colonización micorrizica

Cuando se evaluó el porcentaje de colonización micorrizica se observó la eficiencia de los HMA debido a que se mostró un aumento de 10% a 90% en ausencia del patógeno *Phytophthora capsici* (Fig I. 9) y en presencia de *Phytophthora capsici* en el tratamiento de HMA + *Azospirillum* mostró un aumento del 10% al inicio del tratamiento y hasta del 100% a los 100 días de tratamiento (Fig I.10). Es importante destacar que los tratamientos con HMA y HMA en interacción con *Azospirillum* disminuyeron notablemente los síntomas como marchitamiento de hojas y pudrición en el sistema radical, lo cual nos hace suponer que estos tratamientos tuvieron un papel importante favoreciendo el control biológico del patógeno *Phytophthora capsici* al disminuir los síntomas y aumentando las estructuras de la micorriza en las raíces colonizadas.

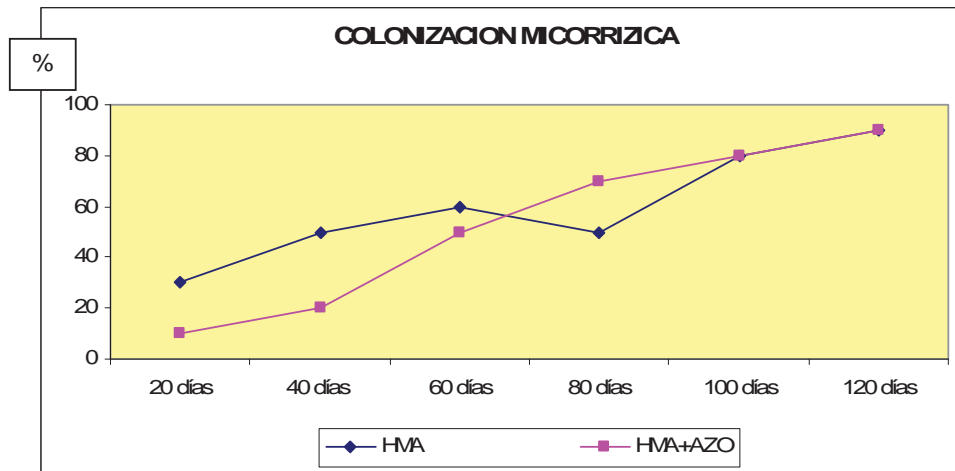


Fig I. 9. Colonización micorrizica en ausencia del patógeno.

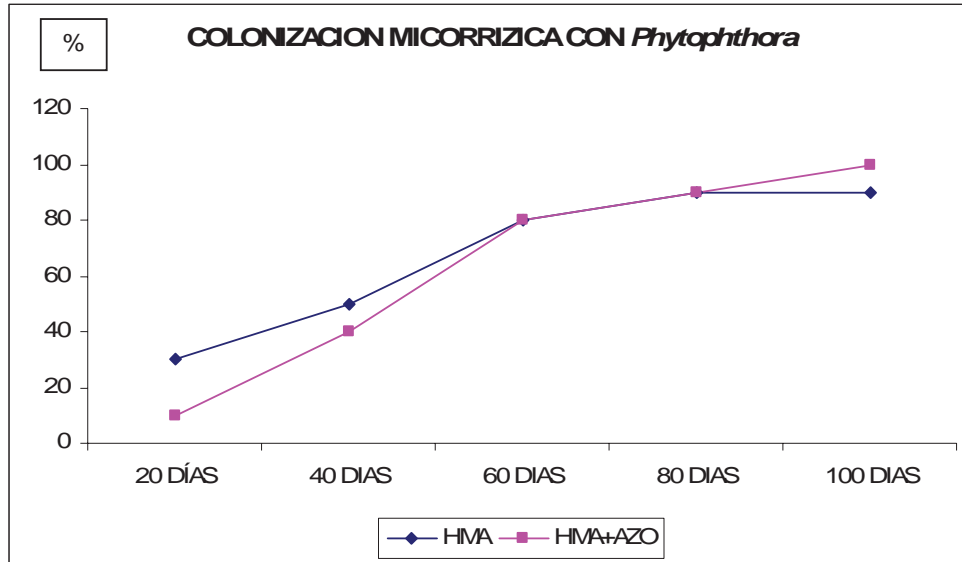


Fig I. 10. Colonización micorrizica en presencia del patógeno.

La presencia del patógeno *P. capsici* ocasionó un aumento en la colonización micorrizica lo cual nos hace suponer que los HMA favorecen a las plantas infectadas al disminuir los daños ocasionados por la enfermedad en las plantas de Chile, aún cuando se encontró que esta variedad es susceptible al daño por *P. capsici* (Fig I. 11).

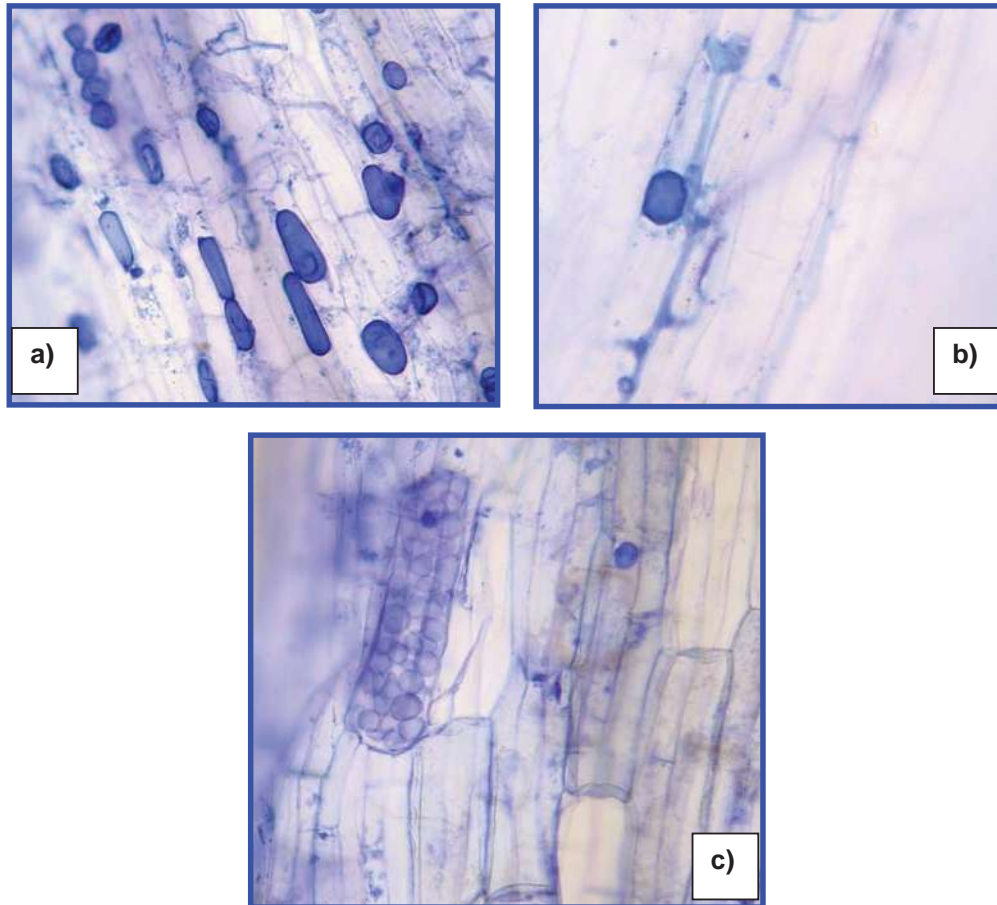


Figura I. 11. Raíces de plantas de Chile *Capsicum annum* L. teñidas con azul de tripano
a) vesículas 40x b) Micelio y vesículas 40x y c) esporas 40x

Asimilación de fósforo

Los resultados obtenidos para la concentración de fósforo asimilado en los tratamientos con HMA y la interacción HMA con *Azospirillum* en presencia del patógeno *P. capsici* muestran que la fijación de este elemento es ligeramente mayor en las plantas con HMA, esto puede ser debido a que la presencia del patógeno *P. capsici* hace que las plantas aumenten sus sistemas de defensa (Fig I. 12).

La presencia de fósforo incrementa el número de pelos radicales para la adquisición de nutrientes, esto depende de la disponibilidad de este elemento.

El estatus nutricional puede ser un factor importante en la susceptibilidad de la planta a la enfermedad. En este experimento se muestra que el fósforo no incrementó los síntomas de marchitamiento.

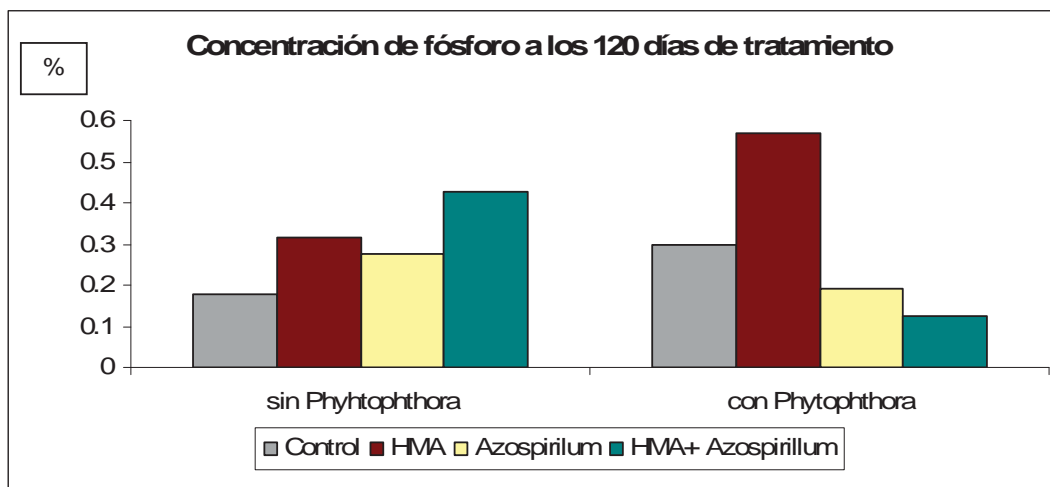


Figura I. 12. Concentración de fósforo

Conclusiones

- 1) La inoculación temprana de los HMA demostró ser el mejor método para asegurar una mejor protección de las plantas frente a patógenos de hábito radical.
- 2) La presencia de los HMA eleva el estatus nutricional de las plantas, aumentando la concentración de fósforo, lo que permite proteger de manera eficiente a las plantas contra agentes patógenos agresivos como *P. capsici*.
- 3) Los HMA son potenciales agentes de control biológico contra *Phytophthora capsici* en las primeras etapas del desarrollo del patógeno en las plantas de Chile.
- 4) La protección proporcionada por el hongo micorrízico, contra el patógeno mostró su efecto en la protección principalmente de las raíces más que en aumento de la captación de nutrientes, sin embargo se requiere de estudios más detallados para investigar los cambios fisiológicos y estructurales de las raíces infectadas por hongos micorrízicos.

Literatura citada

Campbell, R. 1989. **Biocontrol of diseases of roots.** *Biocontrol of microbial plant pathogens.* R. Campbell. Cambridge University press, Great Britain. p 112-159.

Carreón A. Y. & Martínez T. M. 2003. **Efecto del consorcio de hongos micorrízicos arbusculares en la captación del fósforo en plantas de zarzamora (*Rubis fruticosus* L. var. brazos)** *Biológicas* 5:1-8.

Carreón A. Y. & Gómez D. N, Martínez T. M. 2007. **Hongos micorrizógenos Arbusculares y su uso como fertilizantes.** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México. pp. 87.

Dehne, H. 1982. **Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens.** *Phytopathology* 72: 115-1119.

Mosse B, & Hayman, D. 1980. **Mycorrhiza in agricultural plants.** *Tropical mycorrhiza research.* Clarendon Press Oxford, Great Britain. p 213-230.

Oelke L.M & Bosland P.W. 2003. **Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*** *Journal of the American Society for Horticultural Science* 28 (2): 213-218.

Ristaino J.B. 1990. **Intraespecific variations among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina.** *Phytopathology* 80: 1253-1259.

Rosendahl, S, Rosendahl, C y Thingstrup I. 1992. **The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi as biocontrol agent.** *New approaches in biological control of soil borne diseases.* D. Jensen, J Hochanull and N. Fokkena *IOBC/ WPRS Bulletin.* p 48-50.

Sharma D. E and J. B. N Gianinazzi S. 1992. **Vesicular-arbuscular mycorrhizae in relation to plant disease.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 8:559-563.

Schönenbeck, Gruenewaldt-Stoecker & Von Alten. 1994. **Mycorrhizae.** Epidemiology and management of root diseases. C. Campbell and P Benson. Spring Verlag, Germany. P 65-81.

Vigo C., J. R. Norman & J. E. Hooker. 2000. **Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence affects on infection loci.** *Plant Pathology* 49:509-514.

CAPITULO 2

Efecto de la Micorriza Arbuscular y la bacteria *Azospirillum* en la reducción de la susceptibilidad del Chile (*Capsicum annuum* L. var. *tampiqueña*) a *Phytophthora capsici*.

Resumen

Las micorrizas arbusculares (MA) ejercen un papel clave en el establecimiento y desarrollo de las plantas. La influencia de las micorrizas arbusculares en la adquisición de nutrientes del suelo y la protección de la planta por parte de la MA frente a patógenos que afectan el sistema radical ha tenido un papel fundamental en el desarrollo de sistemas agrícolas. Hay cada vez más evidencias experimentales, como la inducción de cambios anatómicos o morfológicos del sistema radical, la alteración de las poblaciones microbianas en la rizósfera o la inducción por parte de la MA de reacciones de defensa de la planta que la harían más resistente al ataque posterior de un patógeno.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que tiene la MA y en interacción con la bacteria *Azospirillum*, en la reducción de la susceptibilidad al patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de Chile.

Se estableció un experimento en condiciones de invernadero, utilizando plantas de Chile, las cuales se sembraron en suelo estéril y arena en proporción 3:1 con un diseño completamente al azar. Se establecieron 8 tratamientos, con todas las combinaciones posibles y 8 repeticiones. El inóculo de HMA se obtuvo de plantas trampa de un consorcio de especies *Glomus* (TIR1), adicionándose 20 g por maceta.

El inóculo de la bacteria *Azospirillum* fue obtenido de un sustrato, se adicionó 7 g por planta, directamente en el transplante. El inóculo de *Phytophthora capsici* se adicionó a los 50 días de tratamiento.

Los resultados muestran que la presencia de los HMA y la interacción HMA con *Azospirillum* tienen una influencia positiva en el crecimiento y desarrollo de la planta. La colonización micorrizica ha sido reportada para reducir la infección de raíces por diferentes patógenos desarrollados en el suelo, para este estudio, la colonización presentó un aumento gradual conforme transcurrían los días de tratamiento, aunque no hay diferencias significativas en la colonización si se encuentran en la respuesta de la planta. Los síntomas de la enfermedad fueron estudiados a través del tiempo en plantas micorrizadas y no micorrizadas, en cuanto a la presencia de zoosporas de *Phytophthora capsici*, los tratamientos control y con sólo *Azospirillum* presentaron el mayor número de zoosporas incluso se evidenció la pérdida en el sistema radical, también hubo una reducción del daño de la parte aérea en plantas con MA y con la interacción MA con *Azospirillum* fueron las que presentaron menos susceptibilidad.

Palabras clave: Influencia, patógeno, respuesta.

Abstract

The Arbuscular Mycorrhizal (AM) has an important role in the establishment and development of plants. The influence of AM in the absorption of nutrients and the plant protection with AM has had a fundamental effect in the development of agricultural systems.

There are more experimental evidences, like induction of anatomic or morphological changes in the radical system, the alteration of microbial populations in the rizosphere and the induction of defense reaction of the plant that provide more resistance to possible pathogen attacks.

The objective of this study was to evaluate the AM effect and the interaction with *Azospirillum* bacteria on susceptibility to *Phytophthora capsici* in pepper plants.

The experiment was carried out under greenhouse conditions, with pepper plants, these plants were grown in sterile soil and sand (3:1 proportion). The experiments were conducted in a completely randomized design. The eight treatments were established, in all possible combinations and with 8 repetitions.

The AM inoculum was obtained with tramp plants with a consortium of *Glomus* sp (TIR1), directly in the transplant, adding 20 g in each pot, *Azospirillum* inoculum was obtained for a substrate added 7g by plant, and *P. capsici* inoculum was added after 50 days.

The results showed that the presence of AM and AM with *Azospirillum* bacteria have a positive influence in the growth and development of pepper plants. The mycorrhizal colonization has been reported to reduce the infection of the roots by different soil borne pathogens, in this study, the AM colonization presented a gradual increase throughout the treatment, although there were no significant differences in the colonization, but there were in plant responses.

The symptoms of disease were studied through time with mycorrhizal plants, about the zoospores of *Phytophthora capsici*, the control and *Azospirillum* treatments showed the highest number of zoospores, even more there was a reduction of the damage in the aerial part of the plants with AM and the interaction with *Azospirillum* were the treatments that presented less susceptibility.

Key words: Influence, pathogen, response.

Introducción

Phytophthora capsici es un patógeno especialmente difícil de controlar por que puede causar múltiples síntomas como infección de raíces, tejido foliar y en el fruto. El control químico es limitado y en la mayoría de los casos es inefectivo contra *Phytophthora capsici* en plantas de Chile (Goldberg 1995; Miller *et al.*, 2002).

Debido a esto, el control mediante el uso de microorganismos es una alternativa en la agricultura y para promover significativamente la sostenibilidad global. La influencia de la Micorriza Arbuscular (MA) en la adquisición de nutrientes de suelo ha sido ampliamente estudiada y documentada. Sin embargo, el estudio de la influencia que tiene en la protección de la planta frente a agentes patógenos que afectan el sistema radical ha recibido menos atención. Los mecanismos involucrados en el control biológico no son muy claros, pero se reporta que inducen la resistencia de la planta a la presencia del patógeno (Cordier *et al.*, 1998).

Se han descrito diversos mecanismos que justifican la protección ejercida por la MA, como la mejora en la nutrición mineral de la planta. Las plantas con MA son resistentes al ataque de patógenos del suelo o presentan una reducción de los daños por el mismo. La capacidad de bioprotección depende del sustrato de crecimiento de la planta y por las condiciones ambientales.

Es vital el estudio de las condiciones favorables para que se manifieste el efecto de la MA y de los mecanismos que favorecen la existencia o no de bioprotección.

Un hecho interesante en explotación vegetal es que la capacidad profiláctica de la MA puede ser explotada en cooperación con la de otros microorganismos rizosféricos antagonistas de patógenos. Podría existir el riesgo que estas bacterias ejercieran un efecto negativo sobre la MA y consecuentemente sobre el establecimiento de la simbiosis.

Sin embargo, hasta ahora no se han detectado tales efectos inhibidores sino, más bien, una acción sinérgica entre este tipo de bacterias incluso cuando han sido manipuladas genéticamente por conseguir una producción de sustancias antifúngicas y MA, aunque también se ha descrito ausencia de efectos o incluso efectos inhibidores. La utilización de consorcios de microorganismos con actividad bioprotectora y que no muestra efectos antagónicos entre ellos, es un área de gran potencial de aplicación (Barea *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1998).

La MA en interacción con la bacteria *Azospirillum* parece ser una buena estrategia para reducir el uso de agroquímicos, puesto que ambos logran reducir e inhibir el crecimiento de patógenos del suelo y elevan el estatus nutricional de las plantas.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que tiene la MA y en interacción con la bacteria *Azospirillum* en la reducción a la susceptibilidad del patógeno *Phytophthora capsici* en plantas de Chile, además de determinar la incidencia de la enfermedad y la sintomatología observada en las plantas.

Materiales y Métodos

El diseño experimental para este proyecto fue completamente al azar, se establecieron 8 tratamientos con 8 repeticiones en todas sus combinaciones, dividido en dos grupos: Experimento 1. Tratamientos en ausencia del patógeno y Experimento 2. Tratamientos en presencia del patógeno *Phytophthora capsici* inoculados a los 50 días de tratamiento Cuadro II.1

1	Plantas Control
2	Plantas con HMA
3	Plantas con <i>Azospirillum</i>
4	Plantas con HMA + <i>Azospirillum</i>
5	Plantas control + <i>Phytophthora capsici</i>
6	Plantas con HMA + <i>Phytophthora capsici</i>
7	Plantas con <i>Azospirillum</i> + <i>Phytophthora capsici</i>
8	Plantas con HMA + <i>Azospirillum</i> + <i>Phytophthora capsici</i>

Cuadro II.1 Tratamientos evaluados en el experimento

Material biológico

Propagación de plantas de Chile

Las semillas seleccionadas de Chile (*Capsicum annuum* var. *tampiqueña*) se esterilizaron en una solución de cloro al 5% durante 5 minutos, posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril y se colocaron en un germinador utilizando un sustrato de suelo y arena estéril en proporción 1:1 (Carreón *et al.*, 2007). La composición del sustrato para los experimentos fue en proporción 3:1 de suelo y arena estéril respectivamente (Fig II.1).

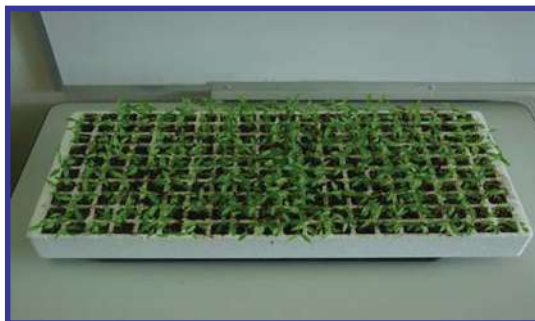


Fig II.1 Germinación de semillas en sustrato estéril

Inoculación micorrizica y de la bacteria *Azospirillum*

El inóculo de la MA se obtuvo de plantas trampa en un consorcio de *Glomus* TIR1, de especies *Glomus* conformado por las siguientes especies: *Glomus invermaium* may, *Glomus mosseae* (Nicol & Ger) Gerd & Trappe, *Glomus aggregatum* Scheck & Smith y *Gigaspora* sp *Aff. margarita* (Carreón & Martínez, 2003) adicionando 20g por maceta.

El inóculo de la bacteria *Azospirillum brasilenses* fue obtenido de un sustrato y se adicionaron 7 g por planta, en el transplante (Fig II.2).



Fig II.2. a) Consorcio de HMA y b) Sustrato de la bacteria *Azospirillum*

Preparación del inóculo de *Phytophthora capsici*

La producción de esporangios y zoosporas se llevó a través del procedimiento de Ristaino (1990) con modificaciones, el inóculo fue obtenido de la Dra. Sylvia Fernández Pavía del IIAF.

El inóculo de *Phytophthora capsici* fue obtenido mediante el procedimiento de Oelke & Bosland 2003. El cultivo puro del patógeno *Phytophthora capsici* fue desarrollado en medio V-8 clarificado agar a 27°C durante 5 a 7 días. Se sembraron 10 cajas para inocular plantas de Chile *Capsicum annuum* L. var. tampiqueña en los diferentes tratamientos. Posteriormente se indujo la esporulación cortando cuadros de micelio de 1 cm y se transfirieron a cajas de petri esterilizadas, a estas cajas se les agregó agua estéril y se incubaron a 27°C de 5 a 7 días.

La inducción de la liberación de zoosporas se inició al colocar las cajas con esporangios a una temperatura de 4°C por un lapso de 30-60 minutos, después de este período de tiempo se dejaron por 15-20 minutos a temperatura ambiente y cuando el número de zoosporas fue abundante, las cuales se observaron al microscopio. Se preparó una suspensión de zoosporas, el agua con zoosporas de todas las cajas, se colocó en un vaso de precipitado, se tomó 1ml de la suspensión y se adicionó una gota de colorante para inmovilizar las zoosporas y poder hacer la cuantificación en ambos lados del hematocitómetro.

Inoculación con *Phytophthora capsici*

Las plantas de Chile *Capsicum annum* L. var. tampiqueña, fueron inoculadas con una suspensión de 1000 zoosporas por planta. El patógeno fue inoculado después de 50 días del transplante siguiendo el método de Oelke & Bosland (2003), la primera cosecha se efectuó a los 8 días después de inocular el patógeno.

Debido a que la variedad de Chile utilizada para esta investigación, resultó ser susceptible al daño ocasionado por el patógeno con la inoculación de 1000 zoosporas por planta, y para comprobar la reducción de los síntomas se realizó un segundo experimento inoculando con el mismo protocolo.

Para esta inoculación se utilizaron 200 plantas a las cuales se les añadió una suspensión de 500 zoosporas en cada una de las plantas (Fig II.3)



Figura II.3. Inoculación del patógeno *Phytophthora capsici*

Conteo de zoosporas

De las raíces de las plantas que fueron inoculadas con el patógeno *Phytophthora capsici*, a los 60 días de tratamiento con 1000 zoosporas por planta y a los 120 días de tratamiento con 500 zoosporas por planta, se seleccionaron algunas para teñirse con rosa de Bengala (0.05%) en alcohol al 70% y se realizó un conteo al microscopio, tomando 10 segmentos de raíz de aproximadamente 1 cm por cada uno de los tratamientos y se procedió a realizar el conteo de zoosporas presentes en cada uno de los segmentos de raíz. *P. capsici* estuvo presente en todas las raíces observadas, la alta patogenicidad puede ser detrimental para el tejido hospedero y la asociación micorrizica, donde el patógeno compete con la MA por sitios de colonización. Este conteo se hizo con la finalidad de someterlo a un análisis estadístico y observar si se encuentran diferencias significativas en el control biológico de *P. capsici* por la interacción MA y *Azospirillum* (Fig II.4)

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico con el programa SPSS 10.0 para Windows (Anexo 1).

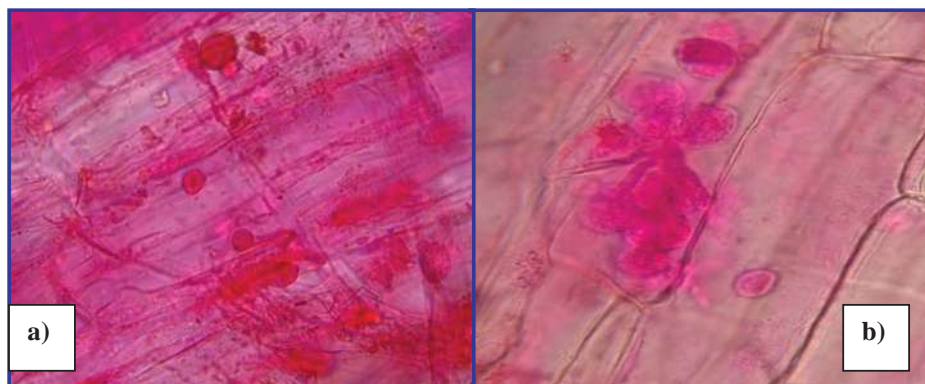


Figura II.4. a) Zoosporas y b) esporangios de *P. capsici* en raíces de plantas de Chile teñidas con rosa de Bengala.

Monitoreo de la severidad de la enfermedad y análisis

Se evaluó la sintomatología cada dos días después de la inoculación del patógeno *Phytophthora capsici*, La cual fue evaluada de manera subjetiva de acuerdo a la severidad manifestada en las plantas evaluando el grado de daño reflejando el área con marchitamiento, necrosis y clorosis, se obtuvo la incidencia de la enfermedad en las plantas a los 100 y 120 días (Fig II.5)

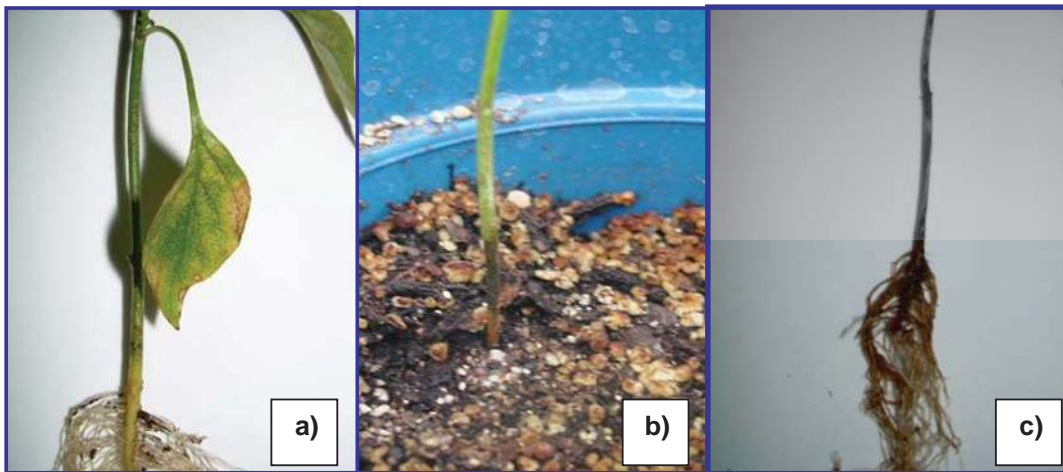


Fig II.5 Severidad de la enfermedad observada en plantas de Chile, a) hoja con marchitamiento, b) tallo con necrosis y c) raíz con clorosis.

Se realizaron cosechas periódicas de las plantas, con el objeto de evaluar las variables agronómicas. Las cosechas se tomaron a los 20, 40, 60, 80, 100 y 120 días aproximadamente.

Las variables que se obtuvieron cada 20 días, fueron:

Peso seco de la parte aérea,

Peso seco de la raíz

Porcentaje de colonización micorrízica

Incidencia de la enfermedad

Conteo de zoosporas presentes en los tratamientos a los 60 y 120 días.

Tinción de raíces en azul de tripano

El procedimiento de tinción de raíces se realizó con la técnica de Phillips & Hayman (1970) modificada por Walker 1997, citados en Carreón *et al*, 2007. Para este método se emplea el colorante Azul de tripano para hacer visibles las estructuras típicas de la simbiosis micorrízica (hifas, vesículas, arbusculos).

Estas raíces se colocaron en un portaobjetos y se observaron directamente al microscopio óptico con los objetivos 40x y 100x, identificando las estructuras de la micorriza, obteniendo el número de segmentos colonizados en cada una de las raíces, para obtener el porcentaje de colonización micorrízica. Los tratamientos a los cuales se les realizó la tinción de raíces fueron los tratamientos 2, 4, 6 y 8 los cuales contienen la MA y la interacción MA con *Azospirillum*.

El porcentaje de colonización se obtuvo cada 20 días de tratamiento, por medio de la fórmula de Phillips & Hayman (1970).

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de los tratamientos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias Tukey. El tratamiento estadístico se realizó utilizando el programa SPSS (10.0) para Windows.

Resultados y Discusión

Peso seco de la parte aérea

Los resultados de los diferentes tratamientos muestran un efecto de la protección por parte de la MA y la MA en interacción con la bacteria *Azospirillum*, debido a que las plantas inoculadas con estos microorganismos e infectadas con *Phytophthora capsici* no presentan reducción en el desarrollo de la planta.

De forma general, en las variables analizadas se encontraron diferencias entre los tratamientos, denotándose un comportamiento diferenciado entre los tratamientos, siendo los tratamientos con MA y la interacción MA con la bacteria *Azospirillum* donde se observaron los valores más altos en peso seco de la parte aérea.

En cuanto al peso seco de las plantas en los dos tratamientos se observa claramente, como los tratamientos con MA y la interacción MA y la bacteria *Azospirillum* se obtuvieron los valores con mayor biomasa (Fig II.6).

Se reporta que la interacción MA con la planta causa un efecto a nivel sistémico elevando la expresión de genes relacionados a la bioprotección no solo en la raíz. Se han encontrado genes incluidos que la mayoría son expresados diferencialmente en respuesta a patógenos en parte aérea, aunque todavía no se sabe cuáles son, pero se sabe que si hay una respuesta por parte de la planta (Galindo-Flores *et al.*, 2007).

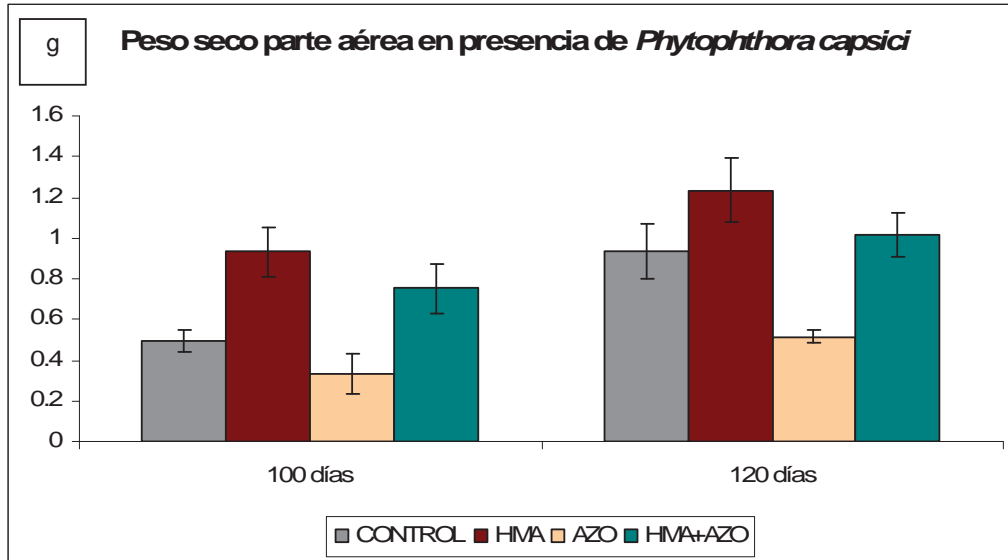


Figura II.6. Peso seco de la parte aérea de plantas de chile en presencia de *Phytophthora capsici*

Peso seco de la raíz

Para el peso seco de las raíces en presencia del patógeno *P. capsici* a los 80 días de tratamiento, la pérdida de raíces fue más notoria, por lo cual las raíces tuvieron una pérdida significativa en su biomasa con respecto a los tratamientos con micorriza.

En los tratamientos con sólo MA y MA en interacción con *Azospirillum* se obtuvieron los valores más altos de peso seco, debido a que no tuvieron un daño severo e incluso se observan las raíces principales sin efecto, el incremento en la biomasa de la raíz puede compensar el tejido dañado por el patógeno y reducir significativamente síntomas de daño (Fig II.7).

Cabe destacar que en los tratamientos con MA fueron en los que se obtuvieron los valores más altos, contrario a lo que se esperaba, esto sugiere la competencia de microorganismos por el sitio de colonización, además de que el inóculo de la bacteria presentó un bajo efecto sinérgico con la MA, *Azospirillum* estimuló el desarrollo del patógeno. El aumento de nitrógeno predispone a la planta a colonización por la enfermedad y por tanto las hace susceptibles a los patógenos, sin embargo es posible que sea la forma del nitrógeno de que disponen el hospedante o el patógeno lo que en realidad afecte la severidad de la enfermedad o la resistencia de la planta más que a la cantidad de nitrógeno en sí (Agrios, 2001).

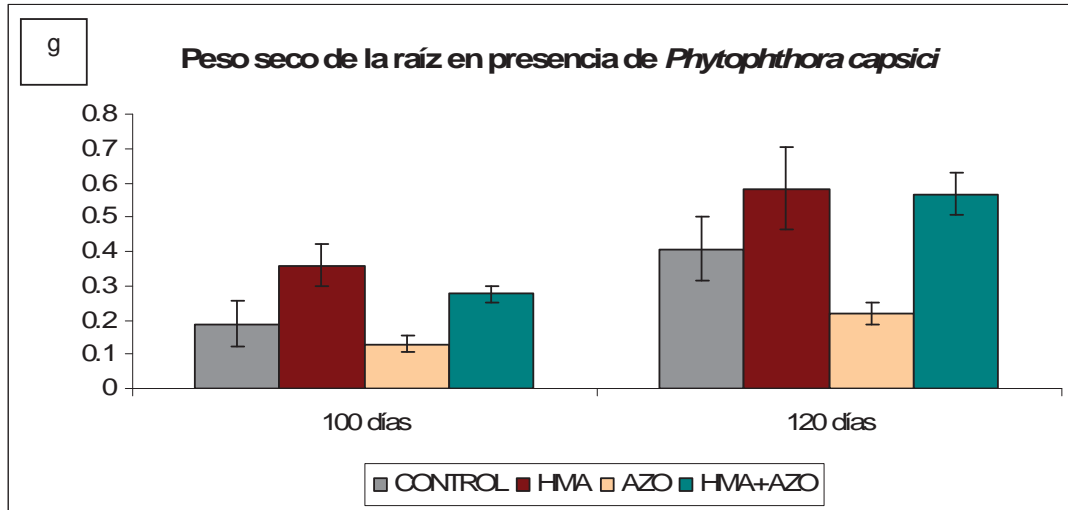


Fig II.7. Peso seco de la raíz de plantas de Chile en presencia de *Phytophthora capsici*.

Colonización micorrizica

La colonización micorrizica, mostró un aumento de 10% a 90% en ausencia del patógeno *Phytophthora capsici* y en presencia de *Phytophthora capsici* en el tratamiento de MA con *Azospirillum* mostró un aumento de 20% al 100% a los 100 días de tratamiento a diferencia del tratamiento con MA que llegó a un 90% de colonización (Fig II.8). Lo cual nos muestra que la colonización micorrizica en presencia del patógeno *P. capsici* estimuló mecanismos de defensa de la planta, permitiendo así la aceleración en la absorción de nutrientes de manera eficaz,

la alta colonización de raíces por la micorriza está asociada con el incremento de las variables evaluadas, es importante destacar que los tratamientos con MA y MA en interacción con *Azospirillum* disminuyeron notablemente los síntomas como marchitamiento de hojas y pudrición en el sistema radical, lo cual nos hace suponer que estos tratamientos tuvieron un papel importante favoreciendo el control biológico de *Phytophthora capsici* al disminuir los síntomas y aumentando las estructuras de la micorriza en las raíces colonizadas.

Estudios estructurales en las interacciones con *Phytophthora* y MA en plantas de tomate, muestran que el patógeno no penetra células que contienen arbusculos (Azcón- Aguilar *et al.*, 2002).

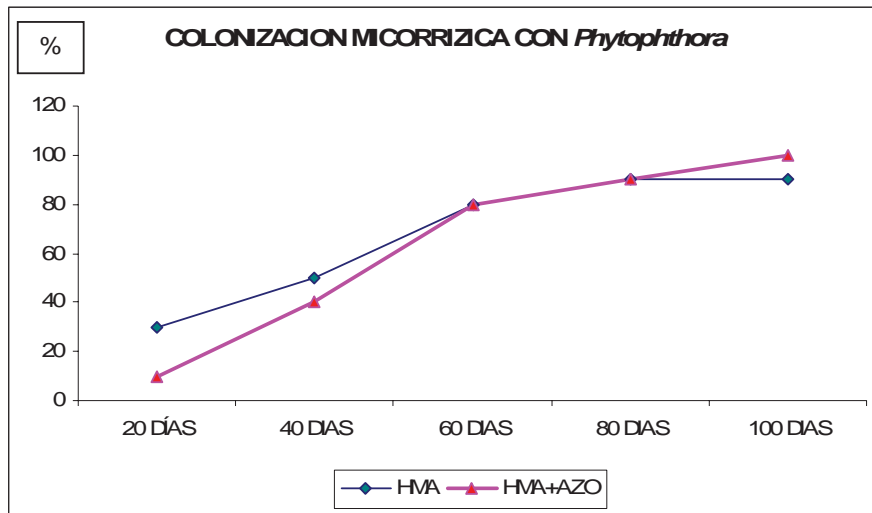


Figura II.8. Colonización micorrizica en presencia del patógeno *Phytophthora capsici*.

Inoculación de *Phytophthora capsici*

El análisis estadístico ($p=0.05$), para el experimento con 1000 zoosporas por planta, mostró que en las plantas tratadas con MA en interacción con la bacteria *Azospirillum* se redujo significativamente la presencia de zoosporas del patógeno *Phytophthora capsici* (Fig II.9). Los datos obtenidos de la inoculación con 500 zoosporas por planta confirman que la utilización de la MA con *Azospirillum* como agentes de biocontrol del patógeno *Phytophthora capsici* en las plantas de Chile es eficiente y confiere protección a las raíces de las plantas evitando que el patógeno prospere (Fig II.10). Anexo 1.

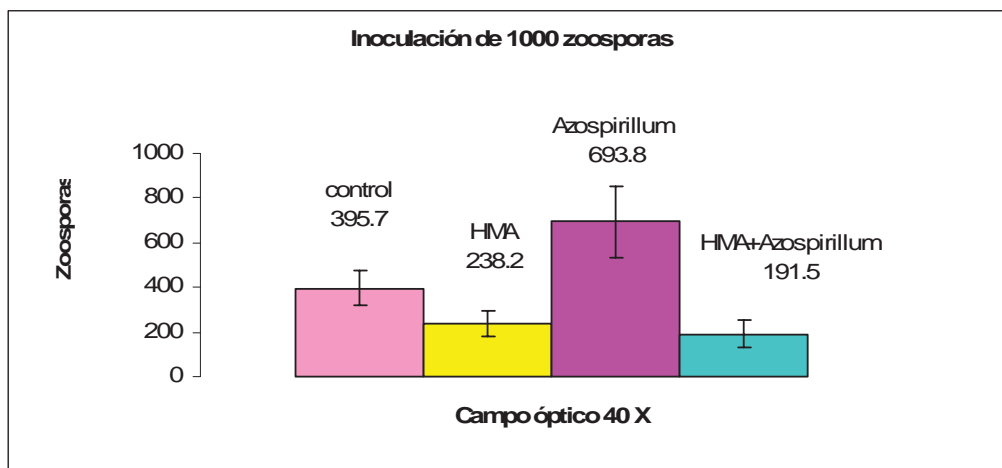


Figura II.9. Tratamientos con la inoculación de 1000 zoosporas por planta

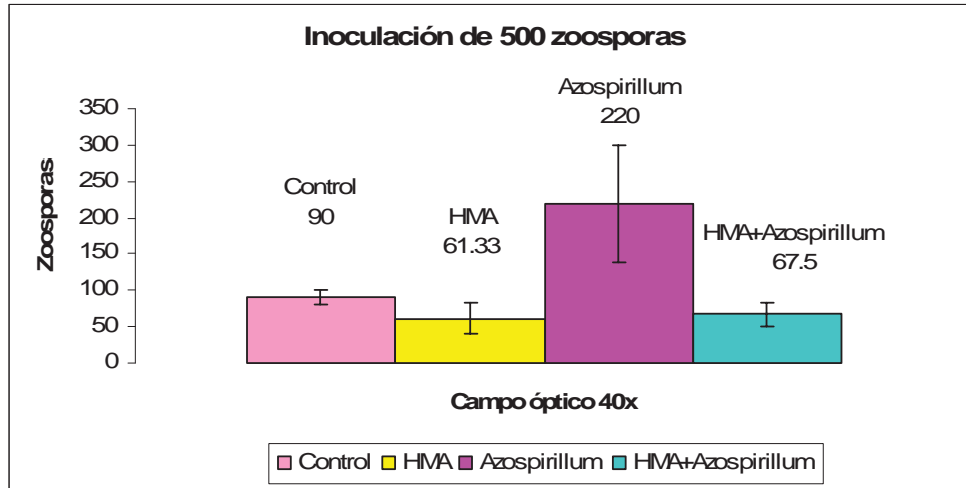


Figura II.10. Tratamientos con la inoculación de 500 zoosporas por planta

La presencia de la MA en las raíces de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña es un factor que influye en la reducción de los niveles de infección por *Phytophthora capsici* en comparación con los tratamientos control y con sólo la presencia de la bacteria *Azospirillum*.

Algunos estudios muestran la protección de la MA en plantas de tomate contra patógenos como *Phytophthora parasitica*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae*. (García Garrido & Ocampo, 1988). En el contexto de un proyecto de investigación, cuyo objetivo era profundizar en los mecanismos que justifican los efectos de las micorrizas, se estudió la capacidad de protección que conferían a plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), *Phytophthora* no inhibió significativamente el crecimiento de las plantas que habían sido colonizadas por *Glomus mosseae*.

De forma similar, las plantas de tomate con *G. mosseae* eran más resistentes al ataque por parte del nematodo fitopatógeno, *Meloidogyne incognita*. En ausencia del nematodo, el HMA, *G. mosseae* estimulaba el crecimiento de las plantas de tomate, pero esta estimulación era mucho mayor en presencia de *M. incognita* (Cordier, et al., 1998).

En general de los estudios realizados sobre el tema se puede concluir, que la MA reducen el daño causado por los patógenos de las plantas que afectan el sistema radical, aunque la capacidad de conferir resistencia y/ o tolerancia no se puede generalizar con todas las MA, ni con todos los patógenos.

Incidencia de la enfermedad

Las observaciones fueron periódicas y de los datos obtenidos se obtuvo el porcentaje de daño ocasionado por el patógeno en las plantas, además de la sintomatología observada en las plantas en presencia de la enfermedad.

Aunque no hay diferencias en la raíz por la presencia del patógeno si hay diferencias en respuesta, se observa que las plantas de Chile *Capsicum annuum* var tampiqueña de ser susceptibles, pasan a ser tolerantes en presencia de la MA (Fig II.11).

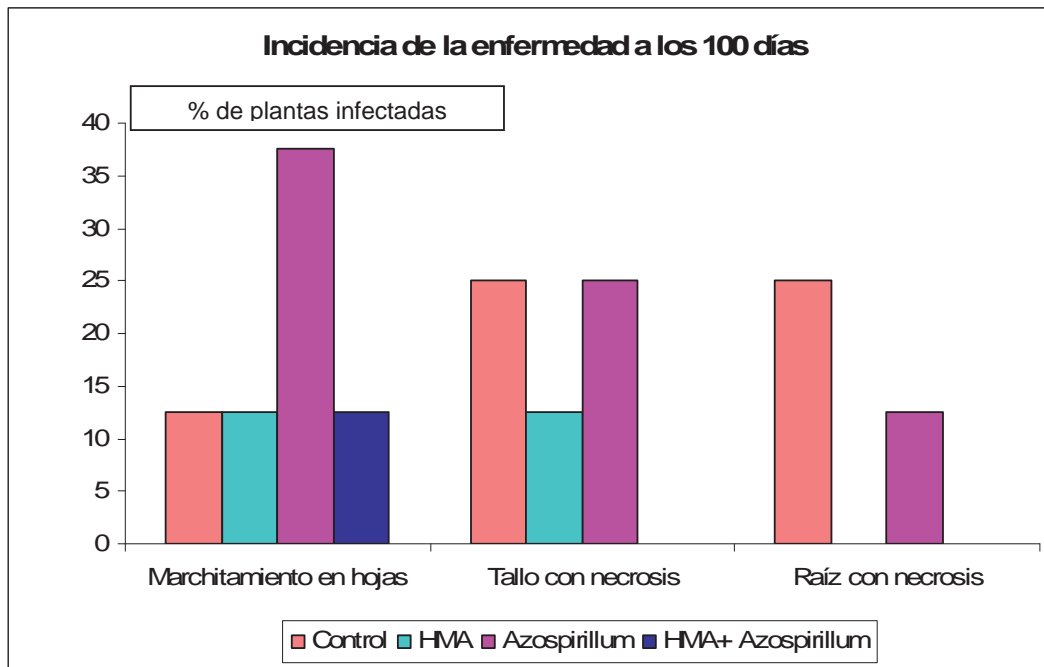


Figura II.11. Porcentaje de plantas infectadas a los 100 días de tratamiento.

A los 120 días se observa claramente como las plantas que fueron afectadas de una manera más evidente, fueron los tratamientos control y con la bacteria *Azospirillum*. Cabe destacar que los tratamientos con MA y MA en interacción con *Azospirillum* fueron los menos afectados por la presencia del patógeno *Phytophthora capsici*, sobre todo en el área del tallo y de la raíz (Fig II.12).

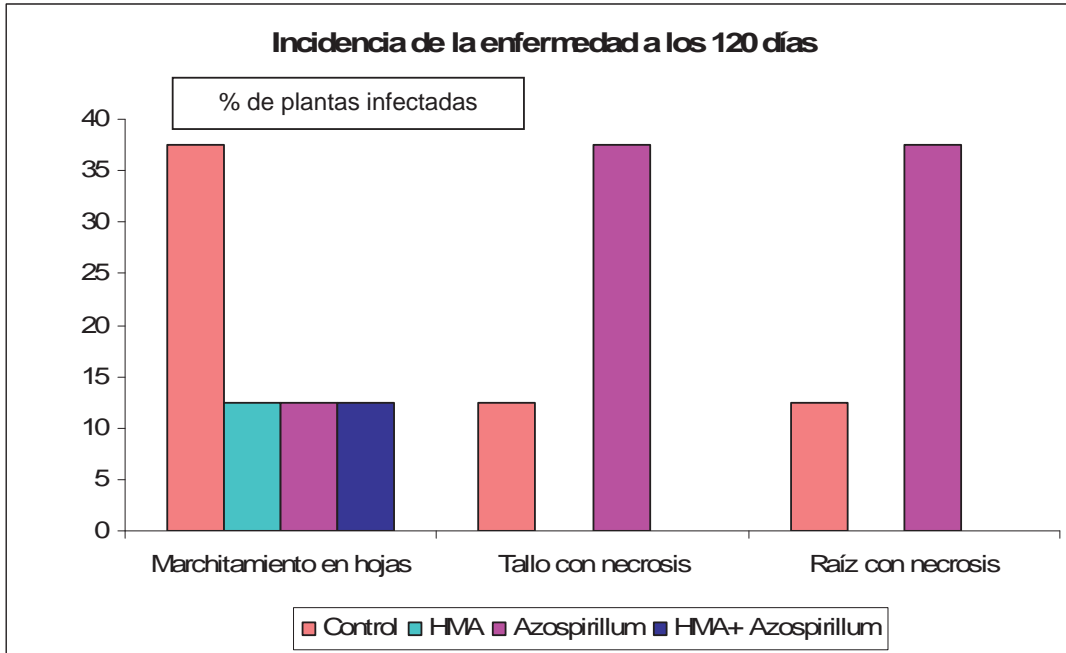


Figura II.12. Porcentaje de plantas infectadas a los 120 días de tratamiento.

Conclusiones

- 1) La MA tuvo una influencia positiva en el crecimiento y desarrollo de las plantas de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña.
- 2) La colonización micorrizica aumentó al 100 % en presencia de *Phytophthora capsici* en el tratamiento con MA y *Azospirillum*, lo cual podría deberse a la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta.
- 3) No se produjo pérdida significativa en el peso de las raíces, ya que la presencia de la MA sólo presentó necrosis en zonas puntuales del sistema radical.
- 4) La micorrización en raíces de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña, puede reducir la susceptibilidad a *Phytophthora capsici*.
- 5) Se encuentra un efecto protector porque la variedad de Chile utilizada se convierte en tolerante por la presencia de la MA.

Literatura citada

Agrios G.N. 2001. **Fitopatología**. Edit Limusa. México D.F 838pp.

Azcón Aguilar C., Jaizme-Vega & Calvet C. 2002. **The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens**. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Switzerland. 187- 198.

Barea J.M, Andrade G., Bianciotto V, Dowling D, Lohrke S., Bonfante P, D'Gara O., Azcón Aguilar C. 1998. **Impact on Arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil borne plant fungal pathogens** *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2304-2307.

Carreón A. Y. & Martínez T. M. 2003. **Efecto del consorcio de hongos micorrízicos arbusculares en la captación del fósforo en plantas de zarzamora (*Rubis fruticosus* L. var. brazos)** *Biológicas* 5:1-8.

Carreón A. Y, Gómez D.N, & Martinez T. M. 2007. **Hongos micorrizógenos Arbusculares y su uso como fertilizantes**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México. 87pp.

Cordier C., Pozo M.J, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V. 1998. **Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an Arbuscular mycorrhizal fungus**. *Molecular Plant Microbe Interactions* 1017-1028.

Edwards S.G, Young P.W, Fitter A.H. 1998. **Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agent and *Glomus mosseae*, an Arbuscular micorrhizal fungus, within the rizosphere**, *FEMS Microbiology Ecology* 28: 93.

Galindo-Flores H, Mora- Romero G. A, Maldonado M. I, López M. M. 2007. **inducción de bioprotección contra fitopatógenos foliares por hongos micorrízicos arbusculares**. *Memorias del XVI Congreso Mexicano de Botánica*.

García Garrido J.M & Ocampo J.A. 1988. **Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants**. *New Phytology* 110:551-555.

Goldberg N.P. 1995. **Chile pepper diseases**. N.M.College of Agriculture and Home Economics.

Miller S.A, Miller M.L, Ivey L & Mera J. 2002. **Responses of pepper cultivars and experimental breeding lines to *Phytophthora* blight, 2001. Biological and cultural tests for control of plant disease** 17: V 16 DOI: 1094/BC 17. *American Phytopathology Society*.

Oelke L.M & Bosland P.W. 2003. **Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*** *Journal of American Society for Horticulture Science* 128 (2): 213-218.

Ristaino J.B. 1990. **Intraespecific variations among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina**. *Phytopathology* 80: 1253-1259.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Este estudio muestra la habilidad de los HMA en el control del patógeno *P. capsici* en plantas de Chile *Capsicum annuum* L. var. tampiqueña. Los HMA ayudan a la planta hospedera a sobreponerse al ataque por patógenos. Se muestran actividades antagonistas contra patógenos de las plantas, que consecuentemente también pueden actuar de manera sinérgica con los HMA en la protección de la planta. La bioprotección resulta de la preactivación de la respuesta de defensa de la planta por los HMA (Azcón Aguilar *et al.*, 2002). De ahí la necesidad de evaluar la factibilidad de incluirlos como tecnología de componente de estrategias de biocontrol.

Los resultados muestran la respuesta de los tratamientos con HMA y en la interacción con *Azospirillum* en las variables evaluadas. Para la variable altura el análisis indicó diferencias en los tratamientos con HMA y en interacción con *Azospirillum*, los cuales produjeron los mayores valores mientras que los tratamientos Control y con *Azospirillum* tuvieron la longitud menor en las plantas de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña.

El peso seco de la parte aérea presentó diferencias debido al factor HMA, se observa que en los tratamientos con la presencia de los HMA promovió la mayor biomasa e incluso se observó menor severidad del daño ocasionado por *P. capsici*. Existe una respuesta por parte de la planta a la presencia del patógeno la cual se ve manifestada en la biomasa de la planta a nivel raíz, pero también en las hojas y tallo.

En la variable de peso seco de raíz observamos que los tratamientos con presencia de HMA y en interacción con *Azospirillum* se vieron menos afectados por la enfermedad con relación a los tratamientos control y con *Azospirillum*.

El estatus nutricional en ocasiones es un factor importante en la susceptibilidad de la planta a la enfermedad, ya que se muestra que el fósforo evita síntomas de la enfermedad como marchitamiento en este estudio.

El porcentaje de colonización micorrizica muestra que el tratamiento con HMA en interacción obtiene hasta un 100% de colonización en respuesta a la enfermedad, activando el estímulo de mecanismos de defensa de la planta para protección. Se observó la presencia de arbusculos en las raíces analizadas lo cual confirió protección, ya que se sabe que células que contienen arbusculos son inmunes a patógenos (Azcón Aguilar *et al.*, 2002).

El grado de colonización por los HMA ha sido variable pero su efectividad en el control de patógenos del suelo ha sido demostrada en otros cultivos (Gardezi *et al.*, 1999). Los HMA son constituyentes de la microflora natural del suelo, su influencia en la nutrición y en el crecimiento de las plantas hospederas es de gran trascendencia ecológica y fisiológica para el buen funcionamiento y estabilidad de las comunidades vegetales (Gardezi *et al.*, 1999).

Respecto a la incidencia de la enfermedad se observó que los tratamientos control y con sólo *Azospirillum* fueron los más afectados por la enfermedad ocasionada por *P. capsici*, presentaron necrosis en la base del tallo y pudrición en algunas de las raíces, también ocurrió marchitamiento de hojas. Para los tratamientos con HMA y en interacción con *Azospirillum* se observó una mayor protección ya que sólo se observó marchitamiento y en algunos casos necrosis en la base del tallo; la raíz no fue afectada en estos tratamientos.

Se demuestra una reducción en la necrosis de la raíz, Norman *et al.*, 1996, reporta una reducción similar en la necrosis de raíz causada por *P. fragariae* en fresa y también hay un reporte de Cordiel *et al.*, 1998 de un 79% de reducción en necrosis causada por *P. parasitica* en tomate en presencia de HMA.

La extensión del biocontrol logra claramente beneficios de los HMA como agentes de protección contra enfermedades causadas por patógenos como *P. capsici*. Claramente un agente de biocontrol puede influenciar de manera positiva el control o disminuir la severidad del daño por algún patógeno.

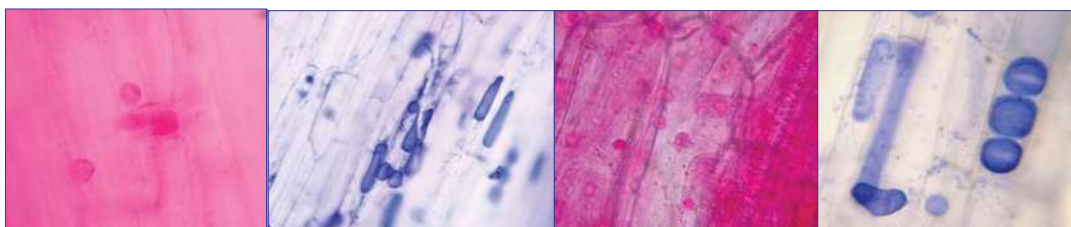
En este estudio los efectos de los HMA fueron medidos para probar la hipótesis de que los efectos de los HMA y en interacción con la bacteria *Azospirillum* fueron en parte responsables del biocontrol de *P. capsici* por HMA.

La perspectiva de esta investigación es la búsqueda de implicaciones importantes para investigaciones de mecanismos futuros y también para investigaciones en aplicaciones de biocontrol. También sugiere que los efectos de protección dependen de una temprana inoculación de HMA previo al ataque por patógenos lo cual puede ser una práctica exitosa para aumentar la tolerancia de la enfermedad.

En plantas de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña sólo un buen establecimiento de colonización micorrízica puede proteger a las plantas. Podemos concluir que la micorrización en raíces de Chile puede inducir la reducción de la susceptibilidad a patógenos como *P. capsici*.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. La colonización micorrizica tuvo un aumento de 10% hasta el 100 % en presencia de *Phytophthora capsici* en el tratamiento con HMA y *Azospirillum*, lo cual estimula los mecanismos de defensa de la planta.
2. El biocontrol logra claramente beneficios de los HMA como agentes de protección contra enfermedades causadas por patógenos como *P. capsici* por que la variedad de Chile utilizada que es susceptible se convierte en tolerante por la presencia de la HMA.
3. Se demuestra una reducción en la necrosis en el sistema radical, debido a la presencia de los HMA, ya que no se produjo pérdida significativa en el peso de las raíces.
4. La micorrización en raíces de Chile *Capsicum annuum* var. tampiqueña, puede inducir la reducción de la susceptibilidad a *Phytophthora capsici*.
5. La presencia de los HMA eleva el estatus nutricional de las plantas, aumentando la concentración de fósforo, lo que permite proteger de manera eficiente a las plantas contra agentes patógenos agresivos como *P. capsici*.



X. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

Atkinson D., Berta G. & Hooker J.E. 1994. **Impact of Mycorrhizal colonization on root architecture, root longevity and the formation of growth regulators.** En: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural ecosystems* (Eds. Gianinazzi S & Schüepp) Birkhäuser Verlag Basel, pp 89-99.

Avelar M. J & Marban M. 1989. **Intentos de control de la marchitez del Chile ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de Valsequillo, Pue.** *Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Montecillo, México.

Azcón C. & Barea, J.M. 1992. **Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms.** *An integrative plant-fungal process* 174 pp, New York.

Azcón-Aguilar C & Barea J.M. 1996. **Arbuscular micorrizas and biological control of soil-borne plant pathogens. An overview of the mechanisms involved.** *Mycorrhiza* 6: 457-464.

Azcón Aguilar C., Jaizme-Vega & Calvet C. 2002. **The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens.** *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Switzerland. pp 187- 198.

Azcón-Aguilar C. Pozo J. Ferrol N & Barea J.M. 2004. **Papel de las micorrizas arbusculares en la protección de la planta frente a patógenos del suelo: Posibles Mecanismos implicados.** Primera edición. pp 50-65.

Barea J.M & Jeffries P. 1995. **Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant systems** En: Varma A & Hock B (Eds) *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Springer-Verlag Heidelberg 521-559.

Barea J.M & Olivares J. 1998. **Manejo de las propiedades biológicas del suelo En: Agricultura Sostenible.** Ed. R. Jiménez Díaz Y J. Lamo de Espinosa Mundi Prensa. Madrid, pp 173-193.

Calvet C, Pinochet J, Camprubí A, Fernandez C. 1995. **Increased tolerance to the root lesion nematode *Pratylenchus vulnus* in mycorrhizal micropropagated BA-29 quince rootstock.** *Mycorrhiza* 5: 253-258.

Canto-Martín J.C, Medina-Peralta S, & Morales Avelino D. 2004. **Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin)** *Tropic & Subtropic Agroecosystems* 4: 21-27.

Carreón A. Y. 2001. **Aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares de suelos del poblado de Tiripetío y análisis de su efecto en el crecimiento y desarrollo de Janamargo y Zazamora.** *Tesis Maestría*. Universidad de Colima. México pp 184.

Dehne H. W. & Schönbeck F. 1979. **The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. 2. Phenol metabolism and lignification.** *Phytopathology* 95: 210-216.

Dowling D.N. & O'Gara F. 1994. **Metabolitos of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant diseases** *Trends Biotechnology*. 12: 133-141.

Edwards S.G, Young J.P.W, & Fitter A.H. 1998. **Interactions between *Pseudomonas fluorescens* biocontrol agents and *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus, within the rizosphere.** *FEMS Microbiology. Ecology* 28: 93.

FAOSTAT 2005: **Bases de Datos Estadísticos de la FAO - Agricultura, Pesca, Silvicultura, Nutrición (Doble CD-ROM)/FAOSTAT 2005: FAO Statistical Databases - Agriculture, Fisheries, Forestry and Nutrition (Set of Two CD-ROMs)** Vols. I & II 06.LI.2

García R.S, Juárez C, Carrillo J.A, Allende R, Márquez I. & Muy-Rangel M.D. 2000. **Marchitez bacteriana en Chile Bell causada por *Erwinia carotovora* Subs. *carotovora*.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 120-124.

Gardezi A.K, García R, Ferrera C & Larque S. 1999. **Effect of arbuscular mycorrhizae on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) in naturally infested soil with *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis lycopersici*** *Revista Mexicana de Fitopatología* 17: 23-28.

González C. M. 1999. **Caracterización de aislados mexicanos de *Colletotricum lindemuthianum* usando marcadores moleculares de ADN y variedades diferenciales y búsqueda de resistencia en variedades mexicanas.** Tesis doctoral. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN. Unidad Irapuato, Irapuato Gto . México.

González, C. M. M., Torres I. & Guevara R. 2001. **Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz (*Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*) en colectas de Chile.** 2do Informe de actividades. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato, Irapuato, Gto. México.

Govindarajan V.S & Sathyanarayana. M.N. 1991. ***Capsicum*: production, technology, chemistry and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition and metabolism, structure, pungency, pain and desensitization sequences.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 29: 435-476.

Greenleaf, W. H. 1986. **Breeding Vegetables Crops.** AVI Publishing Co.

Guijon C. & González P. A. 2001. **Estudio regional de las enfermedades del Chile (*Capsicum annum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México.** *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 49- 56.

Handelsman J. & Stabb E.V. 1996. **Biocontrol of soilborne plant pathogens.** *Plant Cell* 8: 1855-1869.

Jeffries P. & Barea J.M. 2001. **Arbuscular Mycorrhiza a key component of sustainable plant soil ecosystems.** En: *The Mycota*. Vol IX Fungal Associations (Ed. B.Hock) Springer- Verlag, Berlín, Heidelberg. Pp 95-113.

Judelson S. H. & Blanco F.A. 2005 **The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer.** *Nature Reviews* 3: 47-58.

Klett, F. & Garbaye J. 2005. **Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacteria interactions.** *New Phytology* 168: 4-8.

Koide, R. T. 1991. **Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection.** *New Phytology* 117: 365-386.

Leonian L.H. 1972. **Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* sp.** *New Phytology* 401-408.

Linderman R.G. 1992. **Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions** En: Bethlenfalvay G. J & Linderman (Eds). *Mycorrhizae in sustainable agriculture* ASA Special Publication 54. Madison USA pp 45-70.

Mendoza Z.C & Pinto B.C. 1983. **Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos.** Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo México.

Mosse, B. & Hayman, D. S. 1971. **Plant response to vesicular-arbuscular mycorrhiza. II. In: unsterile field soils.** *New Phytology* 70: 29-34.

Norman J.R, Atkinson D, Hooker J.E. 1996. **Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragariae*** *Plant Soil* 185: 191.

Ocampo O. 2001. **Uso de microorganismos rizosféricos en Solanáceas.** *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN U.* Irapuato, Depto. Biotecnología y Bioquímica. Buenavista, Saltillo, IPN.

Olivares J. & Barea J. M. 1991. **Fijación y movilización biológica de nutrientes.** *Consejo superior de investigaciones científicas.* Madrid, España. 149- 172.

Redondo E. 1974. **Estudio preliminar en la obtención de posibles plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas del Hongo *Phytophthora capsici* Leonian.** *Tesis de Maestría.* Escuela Nacional de Agricultura. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.

Romero N.J & Anaya R.S. 1998. **Plagas y enfermedades de las hortalizas de México.** Primera Edición. Antología de SEIT-DGETA. México. pp 26-27.

Schüßler A., Schwarzott & Walter C. 2001. **A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution.** *Mycological Research* 105: 1413-1421.

Smith S. E. 1988. **Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants.** *Plant Physiology*. 23: 221-244.

Smith, S. E. & Read. D.J. 1997. **Mycorrhizal symbiosis.** 2da Edición. *Academic Press London*. pp 605.

Stainer R.Y, Ingraham J.C., Wheeliss M.L. & Painter P.R. 1996. **Microbiología.** 5ta Edición. Reverte. España. p 758.

Thomas B.V., Shreiber A.A & Weisskopf C.P. 1998. **Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography** *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 2655-2663.

Zhang F., Narges D., Hynes R.K. & Smith D. 1996. **Plant growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glycine max* L. Merr) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures.** *Annals of Botanic* 77: 453-459.

Anexo 1

Prueba de Tukey

1000 zoosporas por planta

VAR00002

Tukey HSD

	N	Subset		
VAR00001		1	2	3
D (MA+ <i>Azospirillum</i>)	10	191.5000		
B (MA)	10	238.2000	238.2000	
A (Control)	10		395.7000	
C (<i>Azospirillum</i>)	10			693.8000
Sig.		.909	.131	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square (Error) = 24639.883.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

b Alpha = .05.

Prueba de Tukey

500 zoosporas por planta

VAR00002

Tukey HSD

	N	Subset
VAR00001	1	2
B (MA)	6	61.3333
D (MA + <i>Azospirillum</i>)	6	67.5000
A (Control)	6	90.0000
C (<i>Azospirillum</i>)	6	220.0000
Sig.	.794	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 2901.142.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

b Alpha = .05.