

Pythium spp. ¿POTENCIA LAS POSIBILIDADES DE CONTROL BIOLÓGICO ASOCIADO A LA COMPLEJIDAD MICROBIANA?

Eduardo Molina-Gayosso, Roberto García-Espinosa,
Emma Zavaleta-Mejía, Reyna I. Rojas-Martínez y Jesús Pérez-Moreno

Colegio de Postgraduados, km. 36.5 Carretera México-Texcoco, C. P. 56230. Montecillo,
Mpio. de Texcoco, Edo. de México. E-mail: gayosso@colpos.mx

INTRODUCCIÓN

En estudios realizados en torno a la supresividad de suelos contra enfermedades inducidas por *Pythium aphanidermatum*^{1,2} en la zona de chinampas, Xochimilco, fueron observados hasta 200 propágulos por gramo de suelo de una especie del género *Pythium* que, por su morfología, se creó pertenece a la especie *P. ultimum*. Sin embargo, no hubo evidencia de que este aislamiento de *Pythium* fuese causante de alguna enfermedad en las plantas que ahí se cultivaban (García, R., comunicación personal, 2005). Esta observación puede sugerir que: a) *Pythium* spp. forma parte del complejo fenómeno de supresividad que se observa en esta zona y b) la supresividad presente impide el desarrollo de un estado parasítico de esta especie de *Pythium* spp.

En los últimos años, la investigación realizada en el Laboratorio de Ecología de Enfermedades de la Raíz del Colegio de Postgraduados, ha puesto énfasis en el estudio de consorcios de antagonistas como forma de evitar daños causados por especies de fitopatógenos con origen en el suelo y como una forma de cambiar el enfoque simplista del control biológico tradicional que ha tenido, como eje primario, la introducción masiva de agentes de control biológico individuales³⁻⁶.

El limitado éxito de la introducción masiva de agentes de control biológico individuales se debe a: 1) los microorganismos usados son específicos para determinados patógenos ignorando el hecho de que, generalmente, de manera natural se presentan complejos de patógenos en el suelo, 2) la homeostasis natural del suelo limita el establecimiento del antagonista y/o función antagónica.

El objetivo del presente trabajo fue introducir comunidades con complejidad creciente de antagonistas, así como dos aislamientos de *Pythium* spp., obtenidos en la zona de Chinampas de

Xochimilco, en la rizósfera (en plántulas germinadas en sustratos conteniendo los diversos tratamientos con antagonistas y/o especies de *Pythium*) de plantas de chile (*Capsicum annum*) con la finalidad de disminuir la incidencia y daños causados por patógenos locales con origen en el suelo en El Ajengibre, Municipio Venustiano Carranza, Puebla.

MATERIALES Y MÉTODO

Los microorganismos antagonistas a *Phytophthora capsici* y *Pythium* spp. que fueron usados se tomaron de la colección del Laboratorio de Ecología de Enfermedades de la Raíz del Colegio de Posgraduados (Cuadro I).

Se incluyeron, además dos aislamientos de *Pythium* spp., obtenidos de muestras de suelo de la zona de chinampas de Xochimilco, en medio selectivo 3P (harina de maíz+10 mg/l pimaricina+250 mg/l ampicilina+10mg/l rifampicina, agar 20 g/l) que fueron caracterizados con base en la velocidad de crecimiento en medio de cultivo (PDA+100mg/l estreptomycin+250 mg/l ampicilina).

Los aislamientos, fueron reactivados usando los siguientes medios: para bacterias, medio Agar Nutritivo; para actinomicetos, Agar Nutritivo basificado a pH 11 con hidróxido de potasio y para hongos, el medio Papa Dextrosa Agar (PDA) acidificado con ácido acético.

Una vez reactivado cada aislamiento se multiplicó en 500 gramos de suelo y 1 % de harina de maíz previamente esterilizados por cuatro horas a 15 libras de presión durante dos días consecutivos.

La preparación de los sustratos de germinación consistió en mezclar, en bolsas de polietileno negras, cinco kilogramos de sustrato base (mezcla suelo: peat moss, V:V 1:1, esterilizado 15 lb, 4 hrs por dos días consecutivos) con 500 g de suelo en el que se multiplicó cada uno de los 32 antagonistas y a los dos

Grupo A Bacterias productoras de antibióticos	Grupo B Actinomicetos productores de antibióticos	Grupo C Hongos productores de antibióticos	Grupo D Hongos micoparásitos
BChPc 1 BChPc 2 BChRh4.1 BChRh4.13.2 BChRh4.15.1 BChRh4.19 BChRh4.29 BChRh4.29.1	APcAct1 APcAct2 APcAct 13 APhy 13 APcAct 37 APcAct 44 APcAct 51 APcAct 53	<i>Gliocladium</i> H05 <i>Gliocladium</i> H24 <i>Gliocladium</i> H34 <i>Gliocladium</i> H58 <i>Gliocladium</i> H63 <i>Fusarium</i> H69 <i>Fusarium</i> H74 <i>Penicillium</i> H77	<i>Rhizopus</i> H20 <i>Trichoderma</i> H40 <i>Trichoderma</i> H41 <i>Trichoderma</i> H43 <i>Rhizopus</i> H49 <i>Rhizopus</i> H62 <i>Fusarium</i> H70 <i>Rhizopus</i> H75

Cuadro I. Antagonistas usados en el experimento.

aislamientos de *Pythium* sp.; por consiguiente, se prepararon 34 bolsas, cada una con un aislamiento diferente.

De cada bolsa con microorganismos individuales, se tomaron 3 kg de suelo inoculado para formar cuatro complejos, cada uno con ocho aislamientos, de acuerdo a su grupo y forma de acción: (A) Bacterias antibióticas, (B) Actinomicetos antibióticos, (C) Hongos antibióticos y (D) Hongos micoparásitos. Dos semanas después, se tomaron 3 kg de los complejos A, B, C y D y se preparó el sustrato con 32 antagonistas (ABCD). Este último sustrato se combinó, por separado, con los dos aislamientos de *Pythium* sp. provenientes de suelos de Chinampa. Los diferentes tratamientos son mostrados en el Cuadro II.

Dos semanas después de realizadas las mezclas de grupos (32 antagonistas y 32 antagonistas + aislamientos de *Pythium* spp.), se llenaron charolas para almácigo de 200 cavidades y se sembraron semillas de una variedad comercial de chile. Treinta días después de la siembra (dds) se registró la emergencia de las plántulas. Una vez germinadas, las plántulas se fertilizaron con la adición de 500 ml de solución Nitrofosca-16 (1.66 g por litro de solución) una vez por semana.

Tratamientos	Descripción
TESTIGO	Sustrato base (estéril)
A	Bacterias productoras de antibióticos
B	Actinomicetos productores de antibióticos
C	Hongos productores de antibióticos
D	Hongos micoparásitos
ABCD	Mezcla de grupos
ABCD+Phy1	Mezcla de grupos + aislamiento 1 de <i>Pythium</i> sp.
ABCD+Phy2	Mezcla de grupos + aislamiento 2 de <i>Pythium</i> sp.
Phy-1	Aislamiento 1 de <i>Pythium</i> sp.
Phy-2	Aislamiento 2 de <i>Pythium</i> sp.

Cuadro II. Tratamientos de los sustratos de germinación.

El bioensayo se estableció en el poblado de El Ajengibre, Municipio Venustiano Carranza, en la Sierra Norte del Estado de Puebla. Éste consistió en un diseño experimental de bloques al azar con 5 repeticiones y unidades experimentales conformadas por parcelas de 3 m² con 2 surcos y 5 plántulas en cada uno.

Se tomaron valores de altura (como medida indirecta de la producción de biomasa) y porcentaje de plantas sobrevivientes 35 días después del transplante (ddt), 64 ddt y 98 ddt. Se realizó una única fertilización de Nitrofosca-16, 35 ddt individualmente por adición sobre la superficie del suelo de aproximadamente 5 g del fertilizante a 5 cm del tallo.

También, se tomaron 35 días ddt muestras de raíz de las plantas que presentaban síntomas de "secadera" (enfermedad causada por *Pythium* spp. o *Phytophthora* spp.). Las muestras fueron sembradas en un medio selectivo a *Pythium* spp. (3P), así como a *Phytophthora* spp. (PARPH, medio que es igual al 3P, excepto por la adición del antibiótico Himexazol, que impide el crecimiento de especies de *Pythium* pero permite el de especies de *Phytophthora*). Los datos de cada variable se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS

La totalidad de los tratamientos en el almácigo presentaron el 100% de germinación. No obstante los tratamientos A, así como Phy-1 y Phy-2 germinaron 2 días antes que los demás tratamientos. Treinta dds se tomaron valores de altura promedio previo al transplante (Cuadro III).

En los tratamientos ABCD+Phy1, Phy-2 y A se observó un incremento en vigor en el almácigo manifestado como mayor altura de plántula mientras que la menor altura se registró para la mezcla de grupos del tratamiento ABCD (Cuadro III).

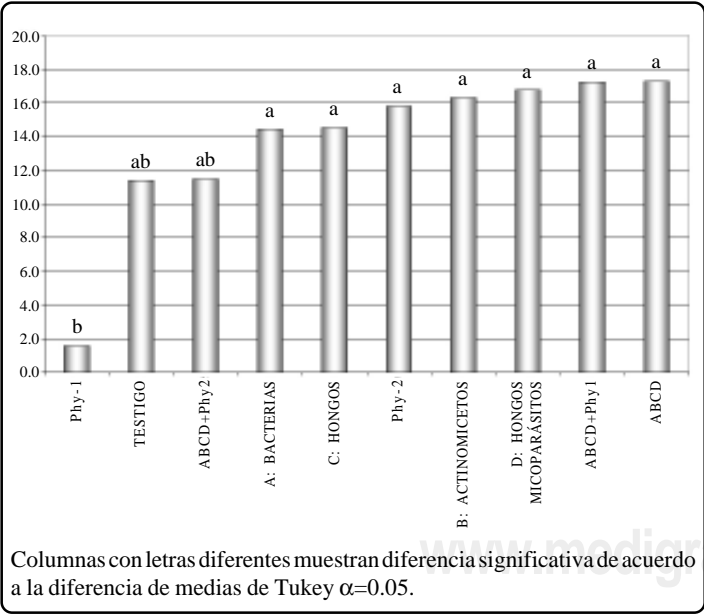
En campo, la mayor altura registrada fue para el tratamiento ABCD superando en 34% al testigo y en 91% al tratamiento Phy-1 (Gráfica 1).

Tratamientos	Altura (cm)
TESTIGO	11.0
A	14.0
B	10.0
C	13.5
D	13.5
ABCD	8.0
ABCD+Phy1	17.0
ABCD+Phy2	11.0
Phy-1	11.0
Phy-2	14.0

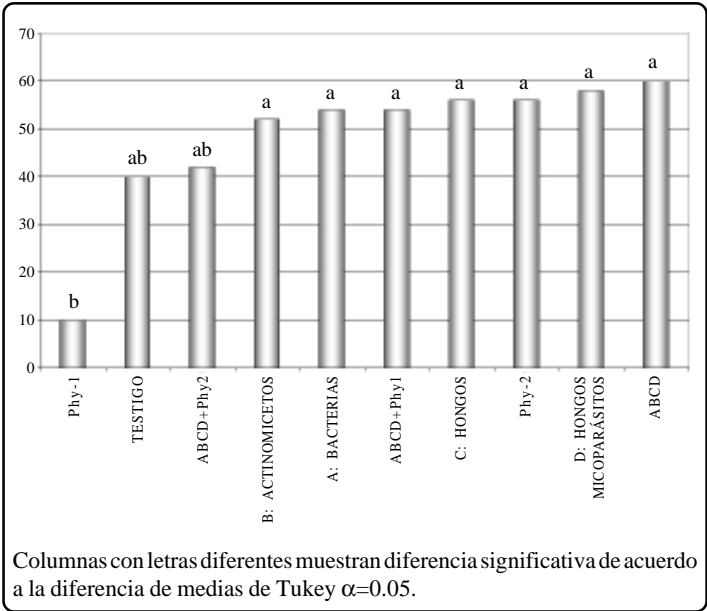
Cuadro III. Altura promedio de las plántulas al momento del trasplante.

Cabe resaltar el contraste en comportamiento de los dos aislamientos de *Pythium*. Mientras la altura promedio de las plantas con Phy1 fue la más baja, su inclusión en conjunto con los 32 antagonistas, estuvo entre los mejores tratamientos. Por su parte, Phy2 no mostró diferencia estadística frente al del valor más alto de la variable, el tratamiento ABCD ni frente a la mezcla Phy2+ABCD.

Pythium sp. fue aislado de raíces de plantas de los tratamientos que involucraban a Phy-1 y Phy-2 y comparado con aquéllos que fueron aislados y purificados a partir de muestras de suelo de Chinampa, sin observar diferencias morfológicas. Ninguna sección de la raíz de las plantas enfermas permitió la detección de especies de *Phytophthora*. De igual forma, secciones de la raíz enferma



Gráfica 1. Altura promedio por tratamiento, de las plantas de Chile, 98 ddt en El Ajengibre, Puebla.



Gráfica 2. Porcentaje promedio de sobrevivencia por tratamiento, de las plantas de Chile, 98 ddt en El Ajengibre, Puebla.

del testigo, así como de los tratamientos que no incluyeron a los aislamientos de *Pythium* de Chinampa, solamente mostraron incidencia de especies de *Pythium*. Aunque sería necesario realizar una identificación precisa de los aislamientos utilizando, tal vez, técnicas moleculares, se percibe que *Pythium* sp. fue la principal causa de muerte de las plantas bajo condiciones de campo.

La sobrevivencia para el tratamiento ABCD fue la mayor registrada (60%) sin grandes diferencias con los tratamientos A, B, C, D, Phy-2 y ABCD+Phy-1. La menor sobrevivencia se registró para el tratamiento Phy-1 (10%), el testigo (40%) y ABCD+Phy-2 (42%) (Gráfica 2).

En el testigo, murió el 60% de las plantas, mientras que en el tratamiento Phy-2 sólo el 44%. En contraste, el tratamiento Phy-1 mostró un 90% de las plantas muertas.

La combinación de los aislamientos de Phy-1 y Phy-2 con la mezcla ABCD de antagonistas no mostró diferencias estadísticas respecto al testigo con relación a la variable sobrevivencia.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A diferencia del control biológico tradicional, en el que se introducen masivamente agentes de control biológico individuales, la utilización de consorcios de antagonistas ofrece la ventaja de que, si bien diferentes tratamientos actúan de diferente forma en función de las condiciones edáficas y ambientales, éstos actúan siempre de manera positiva en algún punto dentro del ciclo biológico del cultivo³⁻⁷.

Contrario a lo esperado, la germinación en los tratamientos conteniendo a los aislamientos de *Pythium* spp. fue del 100%, es decir, no se mostraron patógenos en el estado de germinación de las semillas. Además, brotaron dos días antes que los demás tratamientos. Adicionalmente, se observó mayor vigor de las plántulas al momento de ser llevadas al campo en los tratamientos ABCD+Phy-1 y Phy-2. Es decir, en apariencia, promueven o aceleran el crecimiento de las plantas de chile.

Los resultados descritos muestran que los aislamientos de *Pythium* spp. se comportan de manera diferente de acuerdo a las condiciones a las que son sometidos, mientras que ninguno de los dos es patógeno en el almácigo. En condiciones de campo, uno de ellos (Phy-1) se comporta de forma patógena (actúa probablemente de forma sinérgica junto con los fitopatógenos locales) y el otro (Phy-2) no tiene efecto sobre la sobrevivencia, ya sea solo o en combinación con el grupo de antagonistas (ABCD).

El aislamiento Phy-2 mostró no ser patógeno y se comportó de manera similar al testigo y a los tratamientos Phy-2+ABCD y ABCD en el porcentaje de sobrevivencia. No fue posible definir, por ausencia de mayor parasitismo por parte de los patosistemas edáficos locales, si este aislamiento pudiera mejorar la protección de la raíz sobre la cual estuvo presente.

Especies de *Pythium* spp. ya han sido reportadas como agentes de control biológico en contra de los fitopatógenos con origen en el suelo como son *Phytophthora* spp., *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum* var. *ultimum*^{8,9}. Especies patógenas pueden actuar como no-patógenas de acuerdo a la naturaleza del suelo y a las condiciones ambientales. Este trabajo preliminar, casualmente sembrado bajo escasa presión del inóculo de patógenos destructivos, como son las especies de *Phytophthora*, no puede aún definir un posible rol de las especies de *Pythium* incluidas en la eficiencia del control biológico de estos patógenos.

CONCLUSIÓN

Los aislamientos Phy-1 y Phy-2 promovieron la germinación y el crecimiento de plántulas de chile en invernadero. No obstante, al parecer, Phy-1 actúa de manera patógena en combinación con los fitopatógenos locales.

Bajo las condiciones de limitado parasitismo por parte de los patosistemas edáficos locales, sólo fue posible definir la naturaleza no patógena del aislamiento Phy-2, pero no el posible rol de las especies de *Pythium* aisladas de suelos de Chinampa en la supresividad de enfermedades con origen en el suelo.

La identificación de la presencia de *Pythium* sp. en la zona chinampera de Xochimilco, era la única información que se tenía. Este constituye el primer bioensayo en torno a aislamientos de *Pythium* sp. procedentes de esta zona desde su primera identificación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Juan de Jesús López, del Poblado El Ajengibre, Mpio. Venustiano Carranza, Puebla, por su apoyo en el desarrollo del trabajo de campo. A la Dra. Juliana Bautista Calles, al M. en C. Clemente de Jesús Ávila García, a la M. en C. Citlaly Hernández Hernández y a la M. en C. Petra Andrade Hoyos, por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

REFERENCIAS

1. Lumsden, R.D., Lewis, J.A., García-Espinosa, R. & Frías-T., G.A. Suppression of pathogens in soils from traditional Mexican agricultural systems. *Phytopathology* **71**, 891-892 (1981).
2. Lumsden, R.D., García-Espinosa, R., Lewis, J.A. & Frías-T., G.A. Reduction of damping-off disease in soils from indigenous Mexican agroecosystems. In: *Agroecology, Researching The Ecological Basis For Sustainable Agriculture* (ed. Gliessman, S.R.) 83-103 (Springer Verlag, New York, 1990).
3. Bautista-Calles, J., et al. Inducción de supresividad de suelos a *Phytophthora capsici* por introducción de consorcios de antagonistas en la rizósfera de cultivos de rotación (en revisión, 2008).
4. García-Espinosa, R. Important biological components to be included in the search for alternatives to the use of methyl bromide in Mexico. In: *Annual International Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*. Orlando Florida. p. 7-1 y 7-2 (1998).
5. García-Espinosa, R. Algunos trabajos en México sobre caracterización e inducción de supresividad de suelos a enfermedades de la raíz. In: *La Edafología y sus Perspectivas al Siglo XXI* (eds. Quintero-Lizaola, R., Reyna-Trujillo, T., Corlay-Chee, L., Ibañez-Huerta, A. & García-Calderón, N.E.) 306-317 (UNAM-Colegio de Postgraduados-Universidad Autónoma Chapingo, México, 2000).
6. García-Espinosa, R. Control biológico y supresividad. In: *Microbiología Agrícola para el siglo XXI* (eds. Ferrera, C.R. & Alarcón, A.) (Trillas, México, 2006).
7. Ezziyiani, M., Requena, M.E., Egea-Gilabert, C. & Candela, M.E. Biological Control of *Phytophthora* Root Rot of Pepper Using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in Combination. *Journal of Phytopathology* **155**(6), 342-349 (2007).
8. Fang, J.G. & Tsao, P.H. Evaluation of *Pythium nunn* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora* root rots of azalea and sweet orange. *Phytopathology* **85**(1), 29-36 (1995).
9. El-Katatny, M., Abdelzaher, H. & Shoukamy, M. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **39**(4), 289-301 (2006).