



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

POSTGRADO EN
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

**EFFECTO DE BACTERIAS Y MICORRIZAS EN EL CONTROL DEL
DAMPING OFF EN PLÁNTULAS DE *Capsicum annuum* L.**

EYRA JUDITH HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

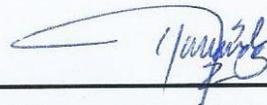
Salinas de Hgo, San Luis Potosí, México
Febrero, 2017

La presente tesis, titulada: **EFFECTO DE BACTERIAS Y MICORRIZAS EN EL CONTROL DEL DAMPING OFF EN PLÁNTULAS DE *Capsicum annuum* L.**, realizada por la alumna **Eyra Judith Hernández Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



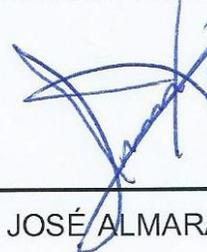
DR. ISMAEL HERNÁNDEZ RÍOS

DIRECTOR DE TESIS:



DRA. MARGARITA TORRES AQUINO

ASESOR:



DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

SALINAS DE HGO., SAN LUIS POTOSÍ
FEBRERO, 2017

EFFECTO DE BACTERIAS Y MICORRIZAS EN EL CONTROL DEL DAMPING OFF EN PLÁNTULAS DE *Capsicum annuum* L.

Eyra Judith Hernández Hernández, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La producción de plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.) en almácigos es afectada por la enfermedad conocida como “damping off”, cuya prevención y tratamiento se hace regularmente mediante fungicidas, cuyo efecto sobre los hongos causantes de esta enfermedad no siempre es efectivo, pero si representa problemas de tipo ambiental. Ante esta situación, el control biológico adquiere mayor relevancia. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general: Evaluar el efecto de 18 aislados bacterianos y un consorcio de micorriza arbuscular como promotoras del crecimiento y agentes de control biológico de hongos causantes del damping off en plántulas de chile tipo “guajillo”. Para alcanzar este objetivo, se procedió a realizar un muestreo de suelo rizosférico de maíz y de plantas de chile con sintomatología de la enfermedad. Se aislaron tres cepas de hongos fitopatógenos del género *Fusarium* sp, (FP, FN y FA; por los colores púrpura, naranja y amarillo desarrollados en el medio de cultivo, respectivamente). En cuanto a cepas bacterianas, se seleccionaron 18 cepas de rizobacterias (B), las cuales fueron confrontadas *in vitro* con las tres cepas de *Fusarium* y una de *Rhizoctonia* sp (R); se realizó su caracterización como promotoras del crecimiento, con base en su capacidad para producir ácido indolacético y solubilizar fosfato insoluble. Los resultados de esta caracterización permitieron seleccionar seis cepas de rizobacterias, que fueron utilizadas en subsecuentes experimentos. La identificación molecular de las cepas, permitió conocer que

estas pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Dos experimentos fueron conducidos bajo condiciones de invernadero, teniendo como objetivos: a) Determinar el efecto de cuatro cepas bacterianas sobre el porcentaje de supervivencia de plántulas de chile “guajillo” inoculadas con hongos fitopatógenos, y b) Evaluar el efecto de la coinoculación bacteria/hongo arbuscular sobre la promoción del crecimiento y efecto protector contra hongos causantes del damping off en plántulas de chile “guajillo”. Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que el damping off en plántulas de chile tipo “guajillo”, cuyos agentes causales sean *Fusarium* o *Rhizoctonia*, puede ser manejada a través del uso de agentes biológicos tales como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y los hongos micorrízicos, cuya eficiencia puede ser mejorada mediante re-inoculación a los 30 días después de la primera aplicación. Esto puede representar una alternativa biotecnológica en el manejo de la enfermedad.

Palabras clave: Damping-off, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, rizobacterias, *Capsicum annuum*.

EFFECT OF BACTERIA AND MYCORRHIZA IN CONTROL OF DAMPING IN SEEDLINGS OF *Capsicum annuum* L.

Eyra Judith Hernández Hernández MC

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The production of chili (*Capsicum annuum* L.) in seedling nurseries is affected by the disease known as “damping off”. Its prevention and treatment is carried out with fungicides, whose effects on this disease are not always effective, but they do represent environmental problems. Under this situation, biological control becomes more relevant. The objective of this research was to evaluate the effect of 18 bacterial isolates and an arbuscular mycorrhizal consortium as growth promoters, and biological control agents of fungi causing damping off on “guajillo” chili seedlings. To reach this objective, samples of rhizospheric soil from a maize plot and chili plants showing the characteristic symptomatology of the disease were used. Three fungi strains of the genus *Fusarium* sp, (identified as FP, FN and FA, by the purple, orange and yellow colors developed in the culture medium, respectively) were isolated. Regarding bacterial strains, 18 strains of rhizobacteria (B) were selected, which were confronted *in vitro* with three strains of *Fusarium* (F) and one of *Rhizotocnia* (R); the production of indoleacetic acid by those bacterial strains, and their capacity to solubilize insoluble phosphate were measured to evaluate their potential as plant growth promoters. The results of this characterization allowed us to select six rhizobacterial strains, which were used in subsequent experiments in this research. The molecular identification of the strains allowed us to know that they belong to the genera *Pseudomonas* and *Bacillus*. Two experiments were conducted under greenhouse conditions and had as objectives: a) to determine the effect of four bacterial strains on the percentage of survival

of guinea-pig chili seedlings inoculated with phytopathogenic fungi, and b) to evaluate the effect of bacterial/arbuscular fungus coinoculation on the promotion of growth and protective effects against fungi that cause damping off on 'guajillo' chili seedlings. Results obtained suggest that damping off in “guajillo” chili seedlings, caused by *Fusarium* or *Rhizoctonia*, can be managed through the use of biological agents, such as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizal fungi, whose efficiency can be improved by re-inoculation 30 days after the first application. This may represent a biotechnological alternative in the management of the disease.

Keywords: Damping off, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, rhizobacteria, *Capsicum annuum*.

DEDICATORIA

A mis padres Luciano Hernández Hernández y Ma. Justina Hernández Hernández por darme la vida.

A mis hermanos Marisol, Israel y Ana Rocío por mostrarme su cariño y apoyo en todo momento.

A mi tío el Padre Baltazar por su estímulo para continuar con mis metas.

A mis demás familiares abuelitos, tíos y primos por estar conmigo.

A Dios por la vida, la familia y por todas las capacidades que sembró en mí para poder disfrutar esta experiencia y proyectarla para el futuro de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Al Colegio de Postgraduados-Campus San Luis Potosí por el programa de Maestría en Ciencias en Innovación en Manejo de Recursos Naturales.

A mi Consejo Particular por su atinada y competente conducción para llevar a término este proyecto de tesis.

A los doctores Aline López López y Bernardo Bañuelos por haber contado con su ánimo y contribución de conocimientos para esta tesis.

Al Padre José J. por su aliento para seguir adelante.

A los M.C. Apolinar González, Cristina Heredia y Deysi del Campus Montecillo por su cercanía y apoyo para llevar a cabo los experimentos en el laboratorio de Microbiología de suelos, Campus Montecillo.

A la M.C. Clara Tovar por las facilidades para trabajar en el laboratorio de agua-suelo-planta, Campus San Luis Potosí.

A mis compañeros de cursos por su amistad que me estimuló a crecer y a continuar en el logro de esta meta.

A todos mis profesores que con su cercanía y ahínco me transmitieron sus conocimientos.

A todos los que me apoyaron indirectamente en llevar a término esta tesis.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
2.3. Hipótesis.....	5
2.4. Hipótesis específicas	6
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
3.1. El Cultivo de Chile en México.....	7
3.2. Sistema tradicional de producción de plántulas de chile.....	8
3.2.1. Manejo del cultivo en el sistema tradicional.....	10
3.3. Secadera temprana, ahogamiento o damping off en plántulas de chile.....	10
3.3.1. Agentes causales de la secadera temprana en el cultivo de chile.....	12
a) <i>Fusarium</i> spp.....	12
b) <i>Rhizoctonia</i> spp.....	14
3.3.2. Sintomatología de la enfermedad.....	15
3.3.2.1. Sintomatología causada por <i>Fusarium</i> spp. en plántulas de chile.....	16
3.3.2.2. Sintomatología causada por <i>Rizoctonia</i> spp. en plántulas de chile.....	17
3.4. Manejo de la enfermedad.....	18
3.5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	20
3.5.1. Rizósfera.....	20
3.5.2. Bacterias benéficas.....	20
3.5.3. Las PGPR como promotoras del crecimiento de <i>Capsicum annuum</i> L.	21
3.5.3.1. Producción de fitohormonas.....	23
3.5.3.2. Ácido indolacético.....	23
3.5.3.3. Solubilización de fosfato mineral.....	24
3.5.4. Las PGPR como agentes de control biológico de enfermedades.....	25
3.5.4.1. Reconocimiento PGPR-planta hospedera.....	25
3.5.4.2. Antagonismo hacia fitopatógenos.....	26
3.5.4.3. Antibiosis.....	27

3.5.4.4. Factores que influyen en la producción de antibióticos y su eficiencia	28
3.5.4.5. Resistencia sistémica inducida	29
3.5.5. Las PGPR como agentes de control biológico en el cultivo de chile	30
3.6. Micorrizas	31
3.6.1. Generalidades sobre la micorriza arbuscular.....	32
3.7. Interacción Bacteria/Micorriza arbuscular/Patógeno	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Caracterización <i>in vitro</i> de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en plántulas de chile ‘guajillo’ (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	37
4.1.1. Aislamientos microbianos	37
4.1.2. Antagonismo microbiano <i>in vitro</i>	38
4.1.3. Producción de ácido indolacético (AIA)	39
4.1.4. Solubilización de fosfato tricálcico insoluble	39
4.2. Identificación molecular de rizobacterias y hongos	40
4.3. Efecto de la inoculación de cepas bacterianas sobre la supervivencia de plántulas de chile tipo ‘guajillo’ inoculadas con agentes causales del damping off	40
4.4. Evaluación del efecto de rizobacterias y micorrizas sobre el crecimiento de plántulas de <i>Capsicum annuum</i> L. tipo ‘guajillo’ inoculadas con hongos patógenos.....	41
4.4.1. Material vegetal, bacteriano y fúngico	41
4.4.2. Diseño de tratamientos	43
4.4.3. Condiciones de crecimiento de las plántulas.....	44
4.4.4. Variables evaluadas.....	44
4.5. Análisis estadístico.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1. Caracterización <i>in vitro</i> de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en plántulas de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	46
5.1.1. Aislamientos microbianos	46
5.1.2. Determinación del antagonismo microbiano <i>in vitro</i>	48
5.1.3. Producción de ácido indolacético.....	51
5.1.4. Solubilización de fosfato tricálcico insoluble	53
5.2. Identificación molecular de rizobacterias y hongos.....	55
5.3. Efecto de la inoculación de cepas bacterianas sobre la supervivencia de plántulas de chile tipo ‘guajillo’ inoculadas con agentes casuales del damping off	56

5.4. Evaluación del efecto de rizobacterias y micorrizas sobre el crecimiento de plántulas de <i>Capsicum annuum</i> L. tipo 'guajillo' inoculadas con hongos patógenos	59
5.4.1. Altura de la planta	59
5.4.1.1. Curvas de crecimiento	59
5.4.2. Producción de materia seca (g)	62
5.4.3. Porcentaje de Fósforo y Nitrógeno foliar	67
5.4.4. Porcentaje de colonización micorrízica total y número total de esporas	70
6. CONCLUSIONES	73
7. LITERATURA CITADA	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Volumen y valor de producción 2015 de los principales Estados productores del cultivo de chile en México (SIAP, 2016).....	8
Cuadro 2. Diseño de tratamientos para evaluar la promoción del crecimiento por bacterias y su interacción con hongos micorrízicos.....	43
Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la promoción del crecimiento por medio del antagonismo de B23.....	43
Cuadro 4. Características morfológicas de 18 aislamientos bacterianos provenientes de la rizósfera de maíz bajo manejo agroforestal	47
Cuadro 5. Ecuaciones de regresión para los valores de altura de los 11 mejores tratamientos con base en su incremento en cm por día.....	60
Cuadro 6. Porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas 100 g suelo en los tratamientos con hongo micorrízico arbuscular en ausencia o presencia del patógeno en la planta.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Almacigos tradicionales en el municipio de Villa de Ramos, S.L.P.....	9
Figura 2. Escala visual del damping off en plántulas de chile, de izquierda a derecha, 0 = ninguna lesión visible; 1 = lesiones \leq 2,5 mm; 2 = lesiones $>$ 2,5 a 5,0 mm; 3 = lesiones $>$ 5,0 mm; 4 = lesiones que rodea la planta; 5 = plantas marchitas o muertas.....	16
Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Das <i>et al.</i> , 2015).....	22
Figura 4. Representación esquemática de diferentes tipos de micorrizas. Simbología: Ar: arbusculo, C: enrollamiento hifal, Eh: hifa extraradical, Hn: Red de Hartig, Fs: manto, P: protusión, Sc: esclerocio, V: vesículas (Agarwal y Sah, 2009).....	31
Figura 5. Esquema de la técnica de dilución y siembra en agar nutritivo (elaboración propia).....	37
Figura 6. Inoculación del patógeno con dos discos de micelio fúngico.....	41
Figura 7. Dispositivo experimental utilizado.....	42
Figura 8. Aislamientos fúngicos provenientes de plántulas de chile ‘guajillo’ que presentaban sintomatología de marchitez fúngica o secadera temprana. a) <i>Fusarium</i> púrpura, b) <i>F.</i> naranja y c) <i>F.</i> amarillo.....	48
Figura 9. Efecto de la cepa B23 sobre la inhibición del crecimiento de cuatro hongos patógenos. a) <i>Fusarium</i> púrpura; b) <i>Fusarium</i> Naranja; c) <i>Fusarium</i> amarillo y d) <i>Rhizoctonia</i> . Con sus respectivos testigos (e, f, g y h).....	49
Figura 10. Efecto de 18 cepas bacterianas sobre el crecimiento micelial de cuatro hongos fitopatógenos, <i>Fusarium</i> púrpura, B) <i>Fusarium</i> naranja, C) <i>Fusarium</i> amarillo y D) <i>Rhizoctonia</i>	50
Figura 11. Producción de ácido indolacético de 18 aislamientos bacterianos provenientes de la rizósfera de maíz. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey 0.05).....	53
Figura 12. Concentración de fósforo solubilizado por aislamientos bacterianos. Columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey 0.05).....	54
Figura 13. Efecto de cuatro bacterias antagonistas en la supervivencia de plántulas de chile ‘guajillo’ inoculadas con diferentes hongos fitopatógenos. a) <i>Fusarium</i> púrpura; b) <i>F.</i> amarillo; c) <i>F.</i> naranja y d) <i>Rhizoctonia</i>	58
Figura 14. Altura de plántulas de chile tipo ‘guajillo’ en plantas control (inoculadas solo con hongos patógenos): a) FP; b) FN; c) FA y d) R. La línea representa la tendencia del modelo y los puntos indican los datos reales.....	61
Figura 15. Efecto de la inoculación de dos cepas de <i>Pseudomonas</i> sobre la producción de materia seca en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C= plantas control inoculadas solo con el patógeno; B8= <i>Pseudomonas chlororaphis</i> ; B14= <i>Pseudomonas</i> spp; B8+B14=inoculación combinada.....	63

- Figura 16.** Efecto de la coinoculación rizobacteria/micorriza sobre la producción de materia seca en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C=control plantas inoculadas solo con el patógeno; M= consorcio *Glomus* spp. Zac-19; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; B8+B14+M=inoculación combinada; B23= *Bacillus* sp.....65
- Figura 17.** Comparación de plántulas de chile infectadas por *Fusarium* spp. (FN, FA, FP) y *Rhizoctonia* (R) e inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* B8; *Pseudomonas* sp. B14; *Bacillus* sp. B23; *Glomus* spp. Zac-19 y plantas control.....66
- Figura 18.** Efecto de la inoculación de rizobacterias y micorrizas sobre el porcentaje de P foliar en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C= Plantas control inoculadas solo con el patógeno; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; M=consorcio *Glomus* spp. Zac-19. (na=no analizado). Columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey 0.05).....68
- Figura 19.** Efecto de la inoculación de rizobacterias y micorrizas sobre el porcentaje de N foliar en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C= Plantas control inoculadas solo con el patógeno; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; M=consorcio *Glomus* spp. Zac-19.....69

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México cuenta con una amplia diversidad de chiles o ajís, caracterizados por su color, olor, sabor, picor y tamaño; principalmente del tipo *Capsicum solanáceae*, *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. sinenses* (Caro *et al.*, 2014). Nuestro país es el primer exportador de chile verde a nivel mundial y el sexto en chile seco. Exporta más de 416 800 toneladas de chiles de diferentes variedades, principalmente a Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania (SIAP, 2010).

En nuestro País, San Luis Potosí, ocupa el cuarto lugar como productor del cultivo de chile, el primer lugar lo ocupa Chihuahua (SIAP, 2016). En el Altiplano Potosino, la producción de plántula de *Capsicum annuum* L. se realiza bajo dos sistemas de producción: tradicional (almácigo) y bajo agricultura protegida. En el presente trabajo se realizaron muestreos de plántulas bajo el sistema tradicional. En el cual, la siembra se realiza directamente en suelo, que en la mayoría de los casos no es previamente desinfectado, asimismo no se efectúa ningún tratamiento a la semilla y una parte importante de los productores utiliza semilla criolla seleccionada del cultivo anterior. La producción de plántulas bajo estas condiciones puede incrementar el riesgo de enfermedades radicales (Velásquez *et al.*, 2014).

En la fase de almácigo, la enfermedad conocida como secadera temprana o “damping off” se considera el principal problema fitosanitario (Velásquez *et al.*, 2007) y se atribuye a un complejo de hongos patógenos que incluye a *Phytophthora capsici*, *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Pythium* sp. (Goldberg, 1995; Rodríguez *et al.*, 2007; Velásquez *et al.*, 2013). Las plántulas pueden ser afectadas de dos formas: marchitez de la planta como consecuencia de la pudrición de sus raíces y afectación a nivel de la base del tallo

(cuello); ambos síntomas originan el colapso de las plántulas (Goldberg, 1995). La incidencia de plántulas enfermas en almácigos puede llegar a ser de hasta un 29% y constituyen una fuente de inóculo que los agricultores transfieren al campo durante el trasplante; las pérdidas del cultivo en almácigo y campo, puede variar entre el 10 al 100% (González *et al.*, 2004; Montero *et al.*, 2013).

Esta enfermedad ha sido reportada en los siguientes Estados productores de chile en México: San Luis Potosí, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo, Michoacán y Colima (Guigón y González, 2001; Velásquez *et al.*, 2002; Anaya *et al.*, 2011). En esos lugares, el patógeno más frecuentemente asociado al “damping off” es *Fusarium* spp. (42.6%), seguido de *R. solani* (37%), y en menor magnitud *P. capsici* (3.9%) (Anaya *et al.*, 2011). Varias especies de *Fusarium* han sido reportadas como las más agresivas, debido a que producen metabolitos secundarios nocivos para las plantas (Hassan *et al.*, 2015).

Desde el descubrimiento de esta enfermedad, los trabajos para controlarla se han enfocado a combatir al hongo a través de: control químico (Parra and Ristaino, 1998), biológico y cultural (Hoitink y Fahy, 1986; Nemeč *et al.*, 1996;) y variedades resistentes (Devika-Rani *et al.*, 2007).

La utilización de fungicidas químicos para el control de patógenos del suelo no siempre es efectivo y el problema de la enfermedad persiste (Huang *et al.*, 2012), además de causar contaminación y efectos nocivos para la salud humana y el medioambiente (Mehetre y Kale *et al.*, 2011). Una alternativa para el control de enfermedades causadas por estos hongos es el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Kloepper

y Schroth 1981), las cuales no presentan efectos negativos sobre el medio ambiente (Mehetre y Kale *et al.*, 2011).

Las PGPR pueden actuar como: a) agentes de biocontrol de enfermedades, a través de una competencia por espacio o alimento, o mediante la producción de antibióticos e inducción de sistemas de defensa de la planta (Matar *et al.*, 2009). La producción de antibióticos por las rizobacterias es comúnmente el sistema de protección que éstas brindan a las plantas contra el ataque de patógenos al reprimir su desarrollo, disminución o prevención de la enfermedad (Saravanakumar *et al.*, 2008); b) promotoras del crecimiento, a través de la producción de moléculas reguladores del crecimiento, como es el caso de la auxina ácido indol-3-acético (AIA) (Goswami *et al.*, 2015), la cual es sintetizada por aproximadamente el 80% de las rizobacterias (Khalid *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2005). El AIA, induce la deformación y desarrollo de pelos radicales, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y desarrollo de los cultivos; y c) solubilizadoras de fosfato inorgánico, a través de la secreción de fosfatasas y ácidos orgánicos que liberan el P mineral u orgánico no disponible; se ha estimado que un 40% de las PGPR presentan esta capacidad (Richardson *et al.*, 2011), entre otros beneficios.

Con base en lo anterior, el presente trabajo contemplo: En una primera etapa realizar el aislamiento de rizobacterias y hongos causantes del Damping off y posteriormente bajo condiciones *in vitro* caracterizar la capacidad de los aislamientos bacterianos como promotores del crecimiento o como agentes de control biológico.

En una segunda etapa, se evaluó la supervivencia de plántulas de chile tipo ´guajillo, para lo cual se realizó la inoculación de las cepas B7, B9, B15 y B23 como agentes de control biológico

y cuatro días después las plántulas fueron inoculadas con hongos fitopatógenos causantes del damping off (*Fusarium* púrpura, *F.* naranja, *F.* amarillo y *Rhizoctonia* sp.).

Finalmente, bajo condiciones de invernadero, se evaluó el efecto de rizobacterias y micorrizas sobre el crecimiento de plántulas de chile tipo 'guajillo' inoculadas con cuatro hongos fitopatógenos.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de 18 aislados bacterianos y un consorcio de micorriza arbuscular como promotoras del crecimiento y agentes de control biológico de hongos causantes del damping off en plántulas de chile 'guajillo' (*Capsicum annuum* L.).

2.2. Objetivos específicos

1. Realizar el aislamiento e identificación de cepas bacterianas de suelo rizosférico de maíz y de hongos fitopatógenos de la raíz de plántulas de chile 'guajillo' con sintomatología de damping off.
2. Caracterizar *in vitro* 18 aislamientos bacterianos como promotoras del crecimiento o agentes de control biológico de cuatro hongos fitopatógenos de chile 'guajillo'.
3. Determinar el efecto de cuatro cepas bacterianas sobre el porcentaje de supervivencia de plántulas de chile 'guajillo' inoculadas con hongos fitopatógenos.
4. Evaluar el efecto de la coinoculación bacteria/hongo arbuscular sobre la promoción del crecimiento y efecto protector contra hongos causantes del damping off en plántulas de chile 'guajillo'.

2.3. Hipótesis

Los aislamientos bacterianos en combinación con el consorcio de micorriza arbuscular producen un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento de plántulas de *Capsicum annuum* L. tipo 'guajillo', así como en el control de hongos patógenos causantes del damping off.

2.4. Hipótesis específicas

1. Al menos una bacteria aislada presenta actividad promotora de crecimiento de plantas o inhibe el crecimiento de los hongos patógenos causantes del damping off, *in vitro*.
2. Al menos una cepa bacteriana con actividad antagonista muestra mayor efecto en el porcentaje de supervivencia de plántulas de *Capsicum annuum* L. 'guajillo' inoculadas con hongos fitopatógenos.
3. Las bacterias con actividad de promoción de crecimiento, el hongo MA y la bacteria con actividad antagonista aplicados por separado en la plántula en presencia del hongo patógeno, promueven el crecimiento de *Capsicum annuum* L. 'guajillo' y al aplicar la combinación de los tres microorganismos producen un efecto sinérgico resultando en un mejor desarrollo de la plántula.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. El Cultivo de Chile en México

México cuenta con una amplia diversidad de chiles o ajís, principalmente del tipo *Capsicum solanáceae*, *C. annum*, *C. frutescens* y *C. sinenses*, caracterizados por su color, olor, sabor, picor y tamaño; (Caro *et al.*, 2014). En nuestro país, se cultivan alrededor de 50 variedades de chile, destacando el serrano, jalapeño, poblano, pimiento morrón, habanero, pasilla y guajillo, cuya cosecha representa el 20.6 % de la producción nacional de hortalizas (SAGARPA, 2015). En 2015, la superficie destinada a este cultivo fue superior a 144 mil hectáreas (chile en verde), de las cuales aproximadamente el 95% fueron de riego y el resto se cultivó bajo condiciones de temporal. Además, más de 60 mil hectáreas se destinan a la producción de chile en seco (SAGARPA, 2015).

Nuestro país es el primer exportador de chile verde a nivel mundial y el sexto en chile seco. Exporta más de 416, 800 toneladas de chiles de diferentes variedades, principalmente a Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania (SIAP, 2010). En el Cuadro 1, se presenta la participación en valor y volumen de producción nacional del cultivo de chile en los principales estados productores, que en conjunto participaron con el 82.69% del valor y el 84.64% del volumen generados durante el año 2015 (SIAP, 2016).

Cuadro 1. Volumen y valor de producción 2015 de los principales Estados productores del cultivo de chile en México (SIAP, 2016).

Estado	Volumen producción		Valor Producción	
	Toneladas	Participación nacional (%)	Miles de Pesos	Participación nacional (%)
Chihuahua	816,234.94	29.34	4,831,085.60	21.39
Sinaloa	601,736.04	21.63	3,808,705.12	16.86
Zacatecas	245,763.40	8.83	2,727,145.47	12.07
San Luis Potosi	221,914.38	7.98	3,276,505.26	14.51
Sonora	130,269.63	4.68	911,558.80	4.04
Michoacán	119,215.83	4.28	1,018,092.48	4.51
Jalisco	117,601.84	4.23	1,170,368.55	5.18
Guanajuato	102,272.69	3.68	933,477.45	4.13
TOTAL	2,355,008.75	84.64	18,676,938.73	82.69

3.2. Sistema tradicional de producción de plántulas de chile

En general, el cultivo de chile se basa en el trasplante, más que en la siembra directa; razón por la cual, la obtención de plántula es una etapa importante y crítica para este cultivo. El sistema tradicional para la obtención de plántula que se utiliza en el Altiplano Potosino es en almácigo, donde se realiza la siembra de semilla chile al voleo, a partir del mes de enero hasta finales de abril o principios de mayo, para posteriormente realizar el trasplante en campo. Esto concuerda con el manejo realizado en los Estados de Aguascalientes y Zacatecas, donde la siembra de almácigos se realiza entre enero y febrero, mientras que el trasplante en el terreno se generaliza a mediados de abril; tiempo durante el cual la pérdida de plantas por bajas temperaturas es mínima (Velásquez *et al.*, 2013)

Los almácigos son pequeñas superficies donde se siembran semillas muy pequeñas en grandes cantidades, para obtener volúmenes altos de plántulas. El sistema tradicional de producción de

plántulas de chile se caracteriza por un reducido uso de tecnología, especialmente en el manejo fitosanitario (Velásquez *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se realizaron visitas de campo a almácigos del cultivo de chile en el municipio de Villa de Ramos, S.L.P. La siembra de semilla de este cultivo se realiza directamente en suelo, que en la mayoría de las ocasiones no es previamente desinfectado; así mismo, no se efectúa ningún tratamiento sanitario a la semilla, lo que es de trascendencia porque una parte importante de los productores utiliza semilla criolla seleccionada del cultivo anterior. Algunos productores acostumbran cubrir con plástico u otro tipo de material su almácigo, lo cual puede favorecer el desarrollo de enfermedades de tipo fúngico debido al incremento de temperatura y humedad bajo cubierta. La producción de plántulas bajo estas condiciones puede incrementar el riesgo de enfermedades radicales (Velásquez *et al.*, 2014).

En la Figura 1 se ejemplifica el sistema tradicional de producción de plántulas en el municipio de Villa de Ramos, S.L.P., sistema que se caracteriza por una acumulación irregular de semilla y aplicación excesiva de agua que arrastra la semilla dentro de las camas del almácigo.



Figura 1. Almácigos tradicionales en el municipio de Villa de Ramos, S.L.P.

3.2.1. Manejo del cultivo en el sistema tradicional

El área donde se establezca el almácigo deberá cubrir ciertas características que favorezcan el crecimiento y desarrollo adecuado de las plántulas, por lo que deben ubicarse en superficies con poca pendiente, con buena fertilidad del suelo, con un buen drenaje de tal manera que los excesos de agua se infiltren. Se sugiere establecer el almácigo en un área sin antecedentes de cultivo de chile o de otra planta de la misma familia botánica como jitomate, tomatillo y papa (Reveles *et al.*, 2010). Además, deberán ubicarse en un lugar cercano a la fuente de agua y de fácil y rápido acceso al productor de tal manera que facilite su manejo y cuidados hasta el momento de la extracción de la planta para el trasplante (Lardizábal, 2002).

Como se mencionó anteriormente en la mayoría de los casos no se realiza la práctica de desinfección del suelo, la cual ha demostrado ser necesaria para el control de plagas enfermedades y malezas por lo que es recomendable incluir esta actividad al momento de realizar el plan de trabajo o calendario de actividades para la producción de plántula (Reveles *et al.* 2010).

3.3. Secadera temprana, ahogamiento o damping off en plántulas de chile

El cultivo de chile es susceptible de presentar daños por enfermedades bióticas y no bióticas en cualquier etapa de su desarrollo. Las enfermedades bióticas son causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus, las cuales pueden atacar varias partes de las plantas o ser específicas de la raíz, tallos, hojas o frutos. Las enfermedades no bióticas o no infecciosas son causadas por factores externos tales como temperatura, luz, humedad del suelo o desbalance nutrimental (Naveed *et al.*, 2014).

A nivel de plántula, la enfermedad biótica más importante es la conocida como secadera temprana, ahogamiento o damping off, cuyos agentes casuales son un complejo de hongos que incluye a *Rhizoctonia* spp, *Fusarium* spp, *Pythium* spp y *Phytophthora* spp., (Velásquez *et al.*, 2002; González-Chavira *et al.*, 2002; Palomo *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2007; Anaya *et al.*, 2011). Estos hongos son capaces de sobrevivir por largos periodos en el suelo, sin necesidad de la presencia del cultivo de chile, empleando para ello estructuras especializadas de resistencia conocidas como esclerocios, oosporas o clamidosporas. Esta enfermedad, puede provocar una mortalidad del 40 al 70% de la población de plántulas (Velásquez *et al.*, 2013).

La secadera temprana o damping off ha sido reportada como la enfermedad más frecuente en la fase de almácigo. Velásquez *et al.* (2014) mencionan que el 75% de los productores de plántula de chile en el Estado de Zacatecas la consideran como el problema principal. Por su parte, Velásquez *et al.* (2007), al realizar un muestreo en municipios de Zacatecas y Aguascalientes, indican que el 88.4% de los almácigos tradicionales de chile presentaron daños por secadera temprana (damping off), cuya área dañada osciló de 1 a 15%. González *et al.* (2004) reportaron una incidencia de plántulas enfermas en almácigos del 29 % en un municipio del Estado de Puebla, señalando que estas plántulas constituyen una fuente de inóculo que los agricultores transfieren al campo durante el trasplante. Con el fin de disminuir la afectación de la enfermedad, los productores tienden a utilizar más semilla de las que normalmente utilizarían, como medio de compensar las pérdidas causadas por esta enfermedad (Subash *et al.*, 2014), aunque en la práctica es solo una solución temporal para disponer de más plántulas para lograr una buena densidad de población al trasplantar, pero es posible que se estén trasplantando

plantas infectadas que podrán mostrar los síntomas y dispersar los hongos del complejo causante de la enfermedad en el cultivo establecido, con los efectos negativos correspondientes.

3.3.1. Agentes causales de la secadera temprana en el cultivo de Chile

A continuación, se describen los hongos *Fusarium* spp y *Rhizotocnia* spp como agentes casuales de la enfermedad debido a que fueron los patógenos con los que se trabajó en la presente investigación.

a) *Fusarium* spp.

Tan pronto como llega a la raíz de la planta, el micelio del hongo se extiende hasta los vasos del xilema, donde forma microconidios y subsecuentemente el micelio y las esporas del hongo ascienden en la planta a través de sus vasos xilemáticos, siendo llevadas las esporas por la corriente de transpiración. Este hongo produce únicamente esporas asexuales. Inverna en el suelo o en restos de plantas en forma de esporas asexuales de pared gruesa denominadas clamidosporas, o bien en forma de micelio o esporas en los restos vegetales (Agrios, 1998).

Es un hongo saprófito y, una vez que se introduce en un terreno de cultivo, se establece ahí por tiempo indefinido; aunque su número poblacional varía en forma considerable, dependiendo de la susceptibilidad y tiempo de cultivo de la planta hospedante en el campo. Este hongo se propaga en el suelo en menor grado en forma de micelio, que se desarrolla en las raíces o restos de plantas; lo hacen principalmente en forma de micelio, esporas o esclerocios llevados por el agua, equipo agrícola, trasplantes, tubérculos, semillas de algunas plantas, esquejes de plantas infectadas y, en algunos casos, en forma de esporas o esclerocios llevados por el viento (Agrios, 1998).

F. oxysporum, ha sido reportado como el agente causal del damping off en plántulas de chile y se considera como uno de los más destructivos en muchas partes del mundo del mundo, incluyendo a México, Egipto, España, India, solo por mencionar algunos países (Chew *et al.*, 2008; Abo y Ahmed, 2007, Pérez *et al.*, 2014; Sundaramoorthy *et al.*, 2012). Esta especie, es un hongo necrotrófico especializado con muchas variedades o cepas patógenas, produce toxinas que afectan la permeabilidad de la membrana celular, alterando el metabolismo de la planta, lo cual contribuye al desarrollo de la enfermedad (Herrera y Ulloa, 1998).

Sundaramoorthy *et al.* (2012) reportan a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como el agente causal de la enfermedad de marchitez de *Capsicum annuum* L., afectando el 90% de la producción en la India, el cual es el primer productor de esta hortaliza. Duan *et al.* (2016) también reportan a *F. solani* (Mart.) Sacc. en China provocando la pudrición de la raíz de chile. En Pakistán, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* han sido encontrados asociados con enfermedades de plantas de chile (Ahmed *et al.*, 2013).

Hassan *et al.* (2015) revelaron que *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum* y *Pythium* sp. fueron los patógenos dominantes con frecuencias de aislamiento de 27, 22 y 18%, respectivamente a partir de plántulas de chile con damping off.

Recientemente apareció una enfermedad fúngica en pimiento (*Capsicum annuum* L.), causada por *Fusarium stilboides*, que afecta al pedúnculo de la fruta en el período postcosecha (Sandoval *et al.*, 2011). Por otra, parte la pudrición interna del fruto de chile ha surgido como una enfermedad del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en invernaderos canadienses, siendo el agente causal principal *Fusarium lactis*, aunque *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg y

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg también han sido implicados en esta enfermedad (Yang *et al.*, 2011).

b) *Rhizoctonia* spp.

Rhizoctonia se caracteriza por sus hifas anchas y con las ramas casi en ángulo recto, adelgazadas y septadas cerca de las intersecciones con el eje principal, y por formar esclerocios morenos. Su nombre se deriva del griego rhiza (raíz) y ktonos (asesino). El género comprende unas 69 especies descritas muchas de las cuales son notables patógenos de plantas, en las que ocasionan pudriciones radicales y marchitamiento (Herrera y Ulloa, 1998). Existe un gran número de diferentes cepas de este hongo encontradas tanto en suelos agrícolas como en otros ambientes. Sin embargo, es extremadamente versátil y puede afectar tanto a frutos como a tallos y hojas. Los hongos del género *Rhizoctonia* no producen conidios (esporas asexuales) y rara vez producen basidiosporas (Pegg y Manners, 2014).

Los grupos de *Rhizoctonia* se definen por su capacidad de fusionarse al crecer juntos, la cual es una forma de "apareamiento" asexual. En la mayoría de los casos, este hongo se reproduce asexualmente. Sin embargo, *R. solani* tiene el basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris* como su teleomorfo (estado sexual) (Pegg y Manners, 2014). *Rhizoctonia solani* representa un importante grupo de hongos patógenos del suelo, el cual afecta a diversas plantas en todo el mundo (Santos, 2010).

R. solani es un complejo de especies, que comprende una serie de grupos genéticamente distintos, con una amplia gama de variabilidad en su morfología, ecología y rango de hospederos y virulencia. *R. solani* fue aislada de plántulas con damping off por Rogers (1943). El hongo fue identificado por las características morfológicas descritas por Duggar (1915), por la

aparición macroscópica de los cultivos y los síntomas obtenidos al inocular las plántulas (Shephard y Wood 1963).

Subash *et al.*, (2014) reportan a *R. solani*, como el agente causal de la enfermedad del damping off en plántulas de *Capsicum annuum* L., así como la podredumbre de raíces y tallos en los trasplantes jóvenes. Mehetre y Kale (2011) también reportaron a *Rhizoctonia* como causante del damping off en el cultivo de chile en condiciones de invernadero y campo. *Rhizoctonia* sp. causó damping off y muerte de plántulas de *Capsicum annuum* L. inoculadas tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero (López *et al.*, 2009).

3.3.2. Sintomatología de la enfermedad

Los síntomas que desarrolla la enfermedad pueden clasificarse en tres tipos de acuerdo con el estado de desarrollo de la plántula: 1) **damping-off pre-emergente**, se caracterizan porque la plántula muere antes de alcanzar la superficie del suelo, en ocasiones antes de salir el hipocotilo de la cubierta de la semilla; en esta fase es muy difícil reconocer la enfermedad y generalmente se le atribuye a fallas de germinación; 2) **damping-off post-emergente**, la sintomatología se localiza en la base del tallo, en forma de necrosis que lo rodea y que tiene la característica de ser hundida, generalmente se manifiesta en los dos primeros meses; y 3) **damping-off tardío**, ocasiona la caída y muerte de la plántula, la raíz también es atacada y presenta una pudrición de color oscuro (Subash *et al.*, 2014).

El damping off post-emergente puede determinarse utilizando la escala visual desarrollada por Cardoso y Echandi (1987), la cual considera valores de 0 a 5, donde: 0 = ninguna lesión visible; 1 = lesiones $\leq 2,5$ mm; 2 = lesiones $> 2,5$ a 5,0 mm; 3 = lesiones $> 5,0$ mm; 4 = lesiones que

rodea la planta; y 5 = plantas marchitas o muertas (Copley *et al.*, 2015). La siguiente Figura, ejemplifica la escala de sintomatología de la enfermedad en plántulas de chile.



Figura 2. Escala visual del damping off en plántulas de chile, de izquierda a derecha, 0 = ninguna lesión visible; 1 = lesiones $\leq 2,5$ mm; 2 = lesiones $> 2,5$ a 5,0 mm; 3 = lesiones $> 5,0$ mm; 4 = lesiones que rodea la planta; 5 = plantas marchitas o muertas.

3.3.2.1. Sintomatología causada por *Fusarium* spp. en plántulas de chile

Cuando plantas sanas son trasplantadas en un suelo contaminado pueden infectarse por este patógeno. El hongo puede invadir la planta a través de los tubos germinales de las esporas o el micelio penetra directamente en las puntas de las raíces, o entran en estas últimas a través de heridas o a nivel de la zona donde se forman las raíces laterales. El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos del xilema, entra en ellos a través de las punteaduras (Agrios, 1988). Debido al crecimiento micelial al interior del xilema, el suministro de agua a la planta se ve afectado, lo cual conduce al cierre de los estomas de las hojas y a la aparición de síntomas de marchitez; finalmente, la planta muere debido a la deficiencia de agua. El hongo invade entonces en gran escala a los tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente. Las esporas son diseminadas hacia nuevas plantas o áreas por medio del viento, el agua y otros factores (Agrios, 1988).

F. oxysporum es un hongo del suelo que posee cepas patogénicas y no-patogénicas. Las cepas no-patogénicas solo colonizan la corteza de la raíz sin causar enfermedad, mientras que las cepas patogénicas invaden el tejido vascular de los huéspedes susceptibles y producen marchitez vascular (Díaz, 2009). La presencia de enanismo en la planta y el amarillamiento de hojas son característicos de *Fusarium* spp. (Yousaf y Khalid, 2007). Por su parte, López *et al.*, (2009) mencionan que este patógeno causa necrosis en las raíces y muerte de plántulas de *Capsicum annuum* L.

3.3.2.2. Sintomatología causada por *Rizoctonia* spp. en plántulas de chile

Subash *et al.* (2014) refieren que *R. solani*, afecta los trasplantes jóvenes mediante la podredumbre de raíces y tallos; causa la enfermedad del damping off de las plántulas, así como la podredumbre de raíces y tallos en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.).

El grupo 8 de anastomosis de *R. solani* (AG8) es el principal causante de la podredumbre de la raíz. El patógeno afecta principalmente a las plántulas y tiene una amplia gama de huéspedes. Las lesiones que rodean la planta y su caída deterioran las funciones de soporte y absorción de la raíz, lo que puede resultar en pérdida de rendimiento o muerte de la planta. En el campo, las plantas presentan parches de retraso de crecimiento o pérdida de plántulas, especialmente en los sistemas de producción de siembra directa. El patógeno sobrevive en los residuos superficiales, aunque en el noroeste del Pacífico sobrevive por debajo del suelo como propágulos infecciosos en forma de hifas monilioides de paredes gruesas o como masas de hifas condensadas llamadas esclerocios (Okubaraa *et al.*, 2014).

3.4. Manejo de la enfermedad

Desde el descubrimiento de esta enfermedad los trabajos para controlarla se han enfocado a interferir al hongo y del tema, se han reportado numerosos trabajos a nivel mundial sobre control químico (Parra and Ristaino, 1998), biológico y cultural (Hoitink y Fahy, 1986; Chávez *et al.*, 1995; Nemeč *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 1996) y variedades resistentes (Devika-Rani *et al.*, 2007).

A continuación, brevemente se describen las diferentes medidas de control del damping off a nivel de plántula:

Control químico. La práctica de desinfección del suelo ha demostrado ser eficiente en el control de esta enfermedad (Reveles *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante determinar el tipo de producto a utilizar; por ejemplo, el metam sodio, puede causar un efecto negativo sobre la biota del suelo y fitotoxicidad del cultivo, evidenciada por una ligera clorosis, necrosis terminal en las hojas y en algunos casos necrosis a nivel del tallo no asociada a la infección por el patógeno. Mejoras en el manejo del producto, tales como un riego preliminar o mayor tiempo de aireación podrían mejorar su eficacia (Lozano *et al.*, 2015). Por otra parte, la aplicación de productos químicos para el control de *Fusarium* a menudo es antieconómico y tiene impactos ambientales negativos, así como el desarrollo potencial de resistencia a fungicidas.

Con respecto al **control cultural**, se recomienda ubicar el almácigo en un terreno o parcela donde no se haya cultivado chile en al menos los últimos cuatro o cinco años, con el fin de reducir el daño por fitopatógenos (Tsrör, 2010; Velásquez *et al.*, 2014), así como evitar riegos pesados y frecuentes cuya excesiva humedad favorecerá el desarrollo de la enfermedad. Si es necesario, suspender el riego en áreas dañadas, hasta que no exista humedad excesiva

(Velásquez *et al.*, 2013). Otro aspecto a considerar es evitar una siembra muy profunda en suelos muy fríos o húmedos, debido a que los tejidos inmaduros de la raíz o tallo son más susceptibles a estas condiciones, propiciando la aparición de la enfermedad (Velásquez *et al.*, 2014). Otra medida de control cultural es la aplicación de composta madura, lo cual ha demostrado un efecto de supresión de hongos del suelo (Hassan *et al.*, 2015), al respecto, Blaya *et al.* (2014) encontraron que la densidad de población de actinomicetos y otras bacterias fue 200 veces mayor al aplicar composta madura con respecto a una composta inmadura, lo cual se asoció en la supresión de *R. solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*. Mientras que el uso de fertilizantes químicos, en particular la fertilización nitrogenada, a altas dosis favorecen la permanencia de los patógenos en el suelo (CuiLin *et al.*, 2001).

Biológico. El uso de microorganismos que actúen como agentes de control biológico de fitopatógenos representa una alternativa para el control de enfermedades del cultivo de Chile, que no contempla el uso de agroquímicos o limite significativamente su uso. Se han reportado diversas especies de rizobacterias antagonistas de un amplio número de hongos fitopatógenos que provocan enfermedades al cultivo de Chile (Guigón y González, 2003). Siendo los géneros *Bacillus*, *Lysobacter* y *Pseudomonas* los más estudiados (Yuen y Schoneweis, 2007).

Pseudomonas fluorescens es un buen agente de control biológico contra varios patógenos de Chile incluyendo *Rhizoctonia solani* (Hassan *et al.*, 2015), esta bacteria induce la acumulación de sustancias fenólicas y proteínas PR (relacionadas con la patogenicidad) en respuesta a la infección por *F. oxysporum* en pimiento (Kavitha *et al.*, 2005). Guillén-Cruz, *et al.* (2006) mencionan, que con el uso de diferentes especies de *Bacillus* se pueden obtener rendimientos similares a tratamientos con fungicidas, lo que permitiría integrar el control biológico en un esquema de manejo integrado de enfermedades en el cultivo de Chile con beneficios al medio

ambiente, reducir toxicidad al humano y reducir la resistencia de patógenos del suelo a fungicidas.

3.5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

3.5.1. Rizósfera

La rizósfera es el volumen del suelo bajo la influencia de las raíces; se define también como la capa del suelo que se adhiere fuertemente a las raíces y se caracteriza por una intensa actividad microbiológica. Es un ambiente ecológico dinámico donde los microorganismos y las plantas interactúan; los microorganismos encuentran en este ambiente substratos energéticos (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, etc.) necesarios para su metabolismo (Beattie, 2006). Se ha señalado que un gramo de suelo puede contener cerca de 10^9 de células bacterianas y alrededor de 10^4 diferentes especies microbianas por gramo de suelo (Cavaletti *et al.*, 2006).

El término rizósfera fue utilizado por primera vez por Lorenz Hiltner en 1904. La rizósfera está poblada por una amplia gama de microorganismos, y las bacterias que colonizan este hábitat se llaman rizobacterias (Schroth y Hancock, 1982). Las bacterias que se asocian a las plantas pueden clasificarse como: benéficas, perjudiciales y neutras, en base a sus efectos sobre el crecimiento de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003). En el presente trabajo sólo se realizó un análisis de las bacterias benéficas debido a que son el objeto de estudio en la presente investigación.

3.5.2. Bacterias benéficas

Las bacterias benéficas de vida libre se conocen habitualmente como PGPR “rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas” (sus siglas provienen del inglés, plant growth-promoting-rhizobacteria, Kloepper *et al.*, 1989).

Bashan y Holguin (1998) propusieron que el término PGPR deberían separarse en dos grupos: las Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas que afectan estrictamente el crecimiento vegetal, y las bacterias de biocontrol, cuando se refiere a bacterias que controlan fitopatógenos, ya sea produciendo sustancias inhibitorias o incrementando la resistencia natural de la planta.

Independientemente de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, las PGPRs colonizan la rizósfera, el rizoplano (raíz) o la raíz misma (dentro del tejido radical) (Gray y Smith, 2005). Está bien documentado que entre 1 y 2% de las bacterias promueven el crecimiento de las plantas en la rizósfera (Antoun y Kloepper, 2001). Se han identificado diversos géneros de bacterias como PGPR; sin embargo, los géneros *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., son predominantes (Podile y Kishore, 2007).

3.5.3. Las PGPR como promotoras del crecimiento de *Capsicum annuum* L.

Diversas investigaciones han demostrado que las rizobacterias son altamente eficientes en el incremento del rendimiento de cultivos mediante la promoción del crecimiento de las plantas a través de la producción de AIA y el incremento en la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y hierro. Además, disminuyen el estrés biótico y abiótico mediante la inducción de la resistencia sistémica (ISR) y la inducción de la tolerancia sistémica (IST), respectivamente (van der Heijden *et al.*, 2008; Berg y Smalla, 2009).

Sundaramoorthy *et al.* (2012) mencionaron que la inoculación de *Pseudomonas fluorescens* promovió el crecimiento de plantas de *Capsicum annuum* L., tanto en invernadero como en campo. Por su parte, Lim y Kim (2010), reportaron un efecto sinérgico de la inoculación de las cepas *B. subtilis* AH18 y *B. licheniformis* K11 sobre el crecimiento de plantas de pimiento rojo

(*Capsicum annuum* L.); además de mantener la capacidad de supresión de la marchitez por *Phytophthora*.

Los mecanismos de acción de las PGPR pueden ser directos e indirectos (Figura 3) y pueden producirse simultáneamente o secuencialmente (Das *et al.*, 2015).

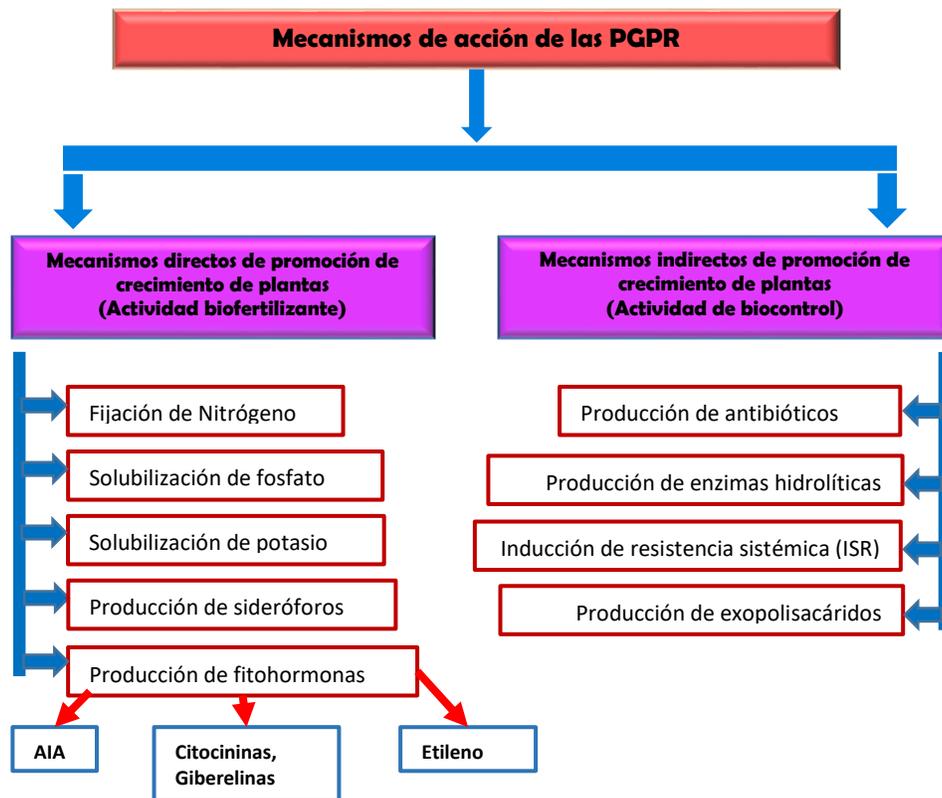


Figura 3. Mecanismos directos e indirectos de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Das *et al.*, 2015).

Los mecanismos directos que ejercen las PGPR sobre el crecimiento de las plantas implican proporcionar compuestos que son sintetizado por la bacteria, por ejemplo, fitohormonas como el ácido indolacético, giberelinas, citoquininas y etileno, o la absorción facilitada de ciertos nutrimentos, siendo los más estudiados el nitrógeno, el fósforo y el hierro (Parray *et al.*, 2016).

3.5.3.1. Producción de fitohormonas

Las fitohormonas, también llamadas hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal, son sustancias producidas por células vegetales en sitios estratégicos de la planta y son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas (Sarabia *et al.*, 2010). Las PGPR, han mostrado la capacidad de producir, excretar y sintetizar una gran diversidad de hormonas en la rizósfera que influyen positivamente en el desarrollo de las plantas, siendo los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium*, los más estudiados (Rojas *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2016). Dentro de las fitohormonas que estimulan el crecimiento de las plantas se destacan las auxinas, las giberelinas y las citoquininas (Melo *et al.*, 2016).

3.5.3.2. Ácido indolacético

La producción de la auxina ácido indolacético (AIA) es común en las PGPR entre los géneros destacan *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Enterobacter*, *Psuedomonas* y *Rhizobium*. El AIA contribuye al aumento de la producción de raíces compensando de esta forma las raíces dañadas por el ataque del patógeno (Shahab *et al.*, 2009). La producción de AIA por rizobacterias estimula la elongación de la raíz primaria y formación de raíces laterales y adventicias, logrando con esto una mayor captación de nutrientes y promoviendo en consecuencia el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Las rizobacterias juegan un papel primordial en los cultivos permitiendo disminuir la utilización de fertilizantes químicos, aumentar el rendimiento, acortar ciclos y, por consiguiente, reducir la contaminación ambiental (Lara *et al.*, 2011). Esta hormona

producida por las bacterias es sintetizada a partir de los exudados producido por la raíz de las plantas a partir del aminoácido triptófano (Salas, 2010).

3.5.3.3. Solubilización de fosfato mineral

El fósforo (P) disponible en el suelo es fácilmente convertido en complejos insolubles, como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y fosfatos de Ca o Mg en suelos alcalinos, razón por la cual se convierte en el mayor factor limitativo para el crecimiento de las plantas (Sharma *et al.*, 2013). Los trabajos de Devau *et al.* (2009) muestran la importancia del pH sobre la disponibilidad de P, modificando la adsorción de los iones fosfato. Por otra parte, una gran porción de fosfatos inorgánicos aplicados al suelo como fertilizantes son inmovilizados después de su aplicación, permaneciendo en forma no asimilable para la planta (Rengel y Marschne, 2005). Los cambios de pH en el rizósfera no solamente provienen de la fisiología de las raíces sino también de poblaciones microbianas asociadas a las raíces. En los últimos años ha crecido el interés en usar microorganismos con la capacidad de solubilizar fosfatos minerales y orgánicos, a través de procesos que incluyen la acidificación, la quelación y las reacciones de óxido-reducción (Harris *et al.*, 2005).

La capacidad para disolver minerales fosfatados insolubles aportados en un medio de cultivo sólido es un rasgo funcional comúnmente utilizado para seleccionar microorganismos llamados “solubilizadores de fosfato”. En la mayor parte de los casos, el fosfato tricálcico es utilizado para efectuar pruebas de solubilización que son positivas si la colonia bacteriana es capaz de desarrollar un halo de disolución alrededor de ella (Mehta y Nautiyal, 2001).

Las formas inorgánicas de P son solubilizadas por un grupo de microorganismos heterotróficos que excretan ácidos orgánicos, los cuales disuelven minerales ricos en fósforo o queletan cationes unidos al fósforo liberando este a la solución (He *et al.*, 2014).

La capacidad para solubilizar P ha sido demostrada tanto en bacterias, hongos y levaduras, entre los géneros bacterianos podemos citar a: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia* y *Erwinia*. Mientras que los hongos más estudiados han sido, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*, así como algunas levaduras (Patiño y Sánchez, 2013).

3.5.4. Las PGPR como agentes de control biológico de enfermedades

Las PGPR pueden ayudar a controlar algunas enfermedades a través de mecanismos indirectos que se producen cuando las bacterias disminuyen o previenen los efectos deletéreos de uno o más organismos fitopatógenos. Esto puede ocurrir mediante la producción de sustancias antagonistas, competencia por nutrientes y nichos, antibiosis, desintoxicación y degradación de factores de virulencia y por la inducción de resistencia a patógenos (Parray *et al.*, 2016).

3.5.4.1. Reconocimiento PGPR-planta hospedera

Los microorganismos que componen la microflora de la rizósfera, están fuertemente regulados tanto por las señales que envía la planta hospedera como por los que ellos mismos envían, ya que existe un "diálogo molecular" en toda la zona. Entre estos microorganismos existe una gran diversidad de interacciones físicas y metabólicas, necesarias para la adhesión, crecimiento y supervivencia, incluso cuando las condiciones ambientales son adversas. Estas comunidades microbianas generalmente se encuentran adheridas a la superficie de las raíces, organizadas en

una comunidad denominada biopelícula. Varios factores abióticos influyen sobre las asociaciones de las biopelículas en la raíz, como son: las variaciones físico-químicas a lo largo de la superficie de la raíz, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura y la humedad relativa, entre otros. Los exudados radicales sirven como principal factor disparador de la colonización de la raíz y las asociaciones de biopelículas (Rojas, 2011).

Las células del borde de la raíz estimulan la esporulación y el crecimiento de las bacterias de la rizósfera, así como la quimioatracción y la expresión de los genes bacterianos involucrados en la asociación y cuando las rizobacterias aprovechan el microambiente favorable de la planta, sin formar estructuras de *novo* sobre la raíz; se habla entonces de una simbiosis asociativa (Loredo *et al.*, 2004).

Bacillus cepa A24 tiene la capacidad de degradar las acilhomoserín lactonas (AHLs, moléculas de señalización) producidas por los patógenos de plantas *Erwinia carotovora* y *Agrobacterium tumefaciens*, lo cual reduce significativamente las enfermedades producidas por estos patógenos en tomate y papa (Rojas, 2011).

3.5.4.2. Antagonismo hacia fitopatógenos

Las bacterias que reducen la incidencia o severidad de la enfermedad en las plantas se denominan agentes de control biológico, mientras que aquellas que presentan una actividad antagónica hacia un patógeno se definen como antagonistas (Beneduzi *et al.*, 2012).

Los hongos del suelo coexisten con varios microorganismos antagonistas que causan un ambiente de inanición y de metabolitos tóxicos. Como resultado, las esporas de muchos hongos que viven en el suelo suelen ser incapaces de germinar en algunos suelos, y este fenómeno se denomina fungistasis, por el que sus tubos germinativos mueren rápidamente (Agrios, 1998).

El antagonismo hacia *F. oxysporum* también podría explicarse por la producción de antibióticos, la competencia por los nutrientes o las interacciones dependientes del contacto entre las bacterias y el patógeno fúngico. Las interacciones bacterianas dependientes del contacto pueden desempeñar un papel clave en la supresión del crecimiento de *F. oxysporum*, ya que las bacterias utilizan sus complejos sistemas de secreción para cooperar o competir con otras especies bacterianas, induciendo vías simbióticas, regulando las vías metabólicas o modulando la fisiología celular y el crecimiento (Mehetre y Kale, 2011).

Por otra parte, bajo condiciones de invernadero *Pseudomonas fluorescens* fue eficaz en suprimir la incidencia de pudrición de la raíz de chile provocado por *Rhizoctonia*. También se demostró la eficacia de *B. licheniformis* como antagonista de *Pythium* spp. que induce el damping off en el cultivo de chile (Mehetre y Kale, 2011).

3.5.4.3. Antibiosis

La antibiosis se define como la inhibición de un agente fitopatógeno debido a la producción de metabolitos secundarios por otro microorganismo. Estos metabolitos antibióticos son capaces de interferir en la germinación, crecimiento fúngico, fisiología celular o la esporulación de agentes fitopatógenos (Rettinassababady y Jeyalakshmi, 2014).

Los antibióticos son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son perjudiciales para el crecimiento o actividades metabólicas de otros microorganismos. La producción de uno o más antibióticos es el mecanismo más comúnmente asociado con la capacidad de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas de actuar como agentes antagonistas contra los fitopatógenos (Glick, 2015).

Se han aislado numerosos tipos de antibióticos a partir de cepas fúngicas y bacterianas, esta diversidad incluye mecanismos de acción que inhiben la síntesis de la pared celular del patógeno, influyen en la estructura de la membrana celular e inhiben la formación de complejos de iniciación en la subunidad pequeña del ribosoma (Beneduzi *et al.*, 2012).

Se han identificado diversos antibióticos, incluyendo compuestos tales como anfisinina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), cianuro de hidrógeno, oomicina A, fenazina, piroluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona y lipopéptidos cíclicos producidos por especies del género *Pseudomonas*. Otra lista de tales compuestos incluye oligomicina A, kanosamina, zwittermicina A y xantobaccina producidas por *Bacillus*, *Streptomyces* y *Stenotrophomonas* spp (Parray *et al.*, 2016). De estos antibióticos, las fenazinas, floroglucinoles, pioluteorin, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos y cianuro de hidrógeno (volátil) ejercen el mejor control biológico de enfermedades de la raíz (Haas y Défago, 2005).

3.5.4.4. Factores que influyen en la producción de antibióticos y su eficiencia

La síntesis de antibióticos está estrechamente ligada al estado metabólico general de la célula, que a su vez está dictada por la disponibilidad de nutrientes y otros estímulos ambientales, tales como macro y micronutrientes, tipo de fuente y suministro de Carbono (C), pH y temperatura, entre otros. Los micronutrientes, en particular los niveles de zinc (Zn) y C, influyen en la estabilidad/inestabilidad genética de las bacterias, afectando su capacidad para producir metabolitos secundarios.

Las condiciones bióticas desempeñan un papel importante en la biosíntesis de antibióticos. Además, el crecimiento y desarrollo de las plantas también influyen en la producción de antibióticos debido a que la actividad biológica productora de DAPG no es inducida por los

exudados de las raíces de plantas jóvenes pero sí por los exudados de las plantas más adultas, lo que resulta en una presión selectiva contra otros microorganismos de la rizósfera. El genotipo de la planta también juega un papel importante en la interacción supresora de la enfermedad de las plantas (Parray *et al.*, 2016).

3.5.4.5. Resistencia sistémica inducida

La resistencia sistémica inducida en la planta por el propio patógeno se denomina resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés), mientras que la resistencia inducida por PGPR y hongos no patogénicos que suprimen enfermedades al inducir mecanismos de resistencia en planta se llama resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés) (Glick, 2015). La ISR fue descrita anteriormente por Van Peer *et al.* (1991) en plantas de claveles que fueron protegidas sistémicamente por la cepa WCS417r de *P. fluorescens* contra *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* y por Wei *et al.* (1991) en plantas de pepino, donde las cepas de rizobacterias protegían las hojas contra la antracnosis causada por *Colletotrichum orbiculare* (Beneduzi *et al.*, 2012).

Los microorganismos que activan la ISR habitan el sistema radical, en el que se induce la resistencia. La vía de señalización es iniciada en los órganos subterráneos de la planta pero abarca también las partes superiores. El ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) juegan un papel importante en esta vía. Estas hormonas vegetales participan en la activación de genes, cuya transcripción y traducción conducen a la formación de compuestos que tienen un efecto negativo sobre los patógenos. La activación se produce sólo después de que la planta es atacada por el fitopatógeno. Los genes responden con mayor rapidez en presencia de JA y ET y su expresión es mejorada y más rápida (Jankiewicz y Koltonowicz, 2012). La ISR se ha asociado

con la mejora de la lignificación y el aumento de la actividad de las enzimas peroxidasa y superóxido dismutasa dentro de la planta tratada. Además, se han implicado varias moléculas bacterianas como señales para la inducción de resistencia sistémica incluyendo la cadena lateral O-antigénica del lipopolisacárido de la proteína de la membrana bacteriana externa, sideróforos bacterianos y, en algunos casos, ácido salicílico (Glick, 2015).

La ISR puede obtenerse solamente cuando el número de células bacterianas alcanza un valor mínimo igual a 10^5 UFC/g (unidad formadora de colonias/g) de la raíz de la planta y el tiempo de colonización de la raíz por la bacteria no es más corto que unos pocos días (Jankiewicz y Koltonowicz, 2012).

3.5.5. Las PGPR como agentes de control biológico en el cultivo de chile

El interés en métodos alternativos para el control de enfermedades de las plantas, ha provocado que se intensifiquen los esfuerzos por detectar microorganismos con potencial como agentes biológicos de control destacándose diversas especies de rizobacterias antagónicas de un amplio número de hongos fitopatógenos que provocan enfermedades en el cultivo de chile (Guigón y González, 2003).

Pseudomonas fluorescens y *Bacillus subtilis* han sido reportadas como inductoras de la resistencia sistémica de la marchitez del chile provocada por *F. solani*, y promotoras del crecimiento de esas plantas (Sundaramoorthy *et al.*, 2012).

El biocontrol, inicia cuando Las bacterias colonizan las raíces en crecimiento y liberan moléculas antibióticas alrededor de la raíz, perjudicando así los patógenos próximos a la raíz. Muchos de esos productos bacterianos inducen un sistema de señalización, lo cual puede resultar en la protección de toda la planta contra las enfermedades causadas por diferentes

organismos. Las bacterias de control biológico actúan compitiendo por nutrientes y nichos que ocupan en la raíz (Sarabia *et al.*, 2010).

3.6. Micorrizas

El término “micorriza” describe la asociación simbiótica que ocurre entre las raíces de plantas y las hifas de ciertos hongos del suelo, y se considera el órgano principal involucrado en la captación de nutrientes por la mayoría de las plantas terrestres.

La clasificación actual reconoce siete diferentes tipos de micorriza: ectomicorriza, arbuscular, orquideoide, ericoide, ectendomicorriza, arbutoide y monotropoide, considerando tanto sus características estructurales como el grupo taxonómico del hongo o la planta involucrada y las alteraciones morfológicas que experimentan las partes en el desarrollo de la nueva estructura (Andrade-Torres, 2010). La figura 4 esquematiza los diferentes tipos de micorriza. Cabe señalar que en la presente revisión solo se abordará la micorriza arbuscular, debido a que fue con la que se trabajó.

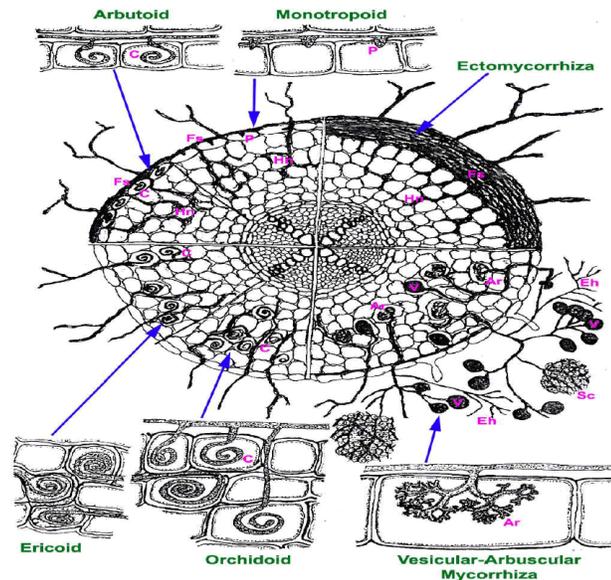


Figura 4. Representación esquemática de diferentes tipos de micorrizas. Simbología: Ar: arbusculo, C: enrollamiento hifal, Eh: hifa extraradical, Hn: Red de Hartig, Fs: manto, P: protusión, Sc: esclerocio, V: vesículas (Agarwal y Sah, 2009).

3.6.1. Generalidades sobre la micorriza arbuscular

La micorriza arbuscular (MA) es una simbiosis mutualista que se establece entre las raíces de plantas y ciertos hongos del suelo y se caracterizan por la colonización intercelular del hongo asociado a una raíz. Esta simbiosis involucra al 80% de las plantas y los hongos involucrados pertenecen al phylum Glomeromycota, el cual contiene poco más de 200 especies. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbiosites obligados, por lo que solo pueden completar su ciclo de vida en presencia de una planta hospedera (Azcón y Barea, 1996).

Las esporas de estos hongos germinan en el suelo y colonizan las células corticales de una planta huésped. Dentro de la raíz, el hongo invagina al plasmalema de la célula vegetal y produce una estructura profusamente ramificada llamada arbusculo, que es el sitio de intercambio de nutrimentos entre el hongo y la planta (Varela y Trejo, 2001).

La formación de una MA se lleva a cabo mediante una sucesión de interacciones entre el hongo y la planta hospedera, lo cual conduce a una integración morfológica y funcional de ambos simbiosites (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996). Durante la formación de la simbiosis hongo y planta hospedera deben comunicarse, por lo que ambos simbiosites producen moléculas de señalización, que dan como resultado la activación de sus genes simbióticos y por lo tanto el desarrollo de nuevos tejidos para el proceso simbiótico. (Akiyama y Hayashi, 2006; Badri *et al.*, 2009). Recientemente se ha indicado, que existe una especie de hormona vegetal llamada estrigolactona producidas por las raíces de las plantas, la cual es capaz de activar los genes de hongos, lo que resulta en la producción de hifas fúngicas (Akiyama y Hayashi, 2006). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) también pueden producir señales moleculares

(conocidas como factores Myc), resultando en una alteración fisiológica y morfológica en raíces de las plantas.

La extensa red de hifas puede crecer en el suelo, incluso más allá de la zona de agotamiento de la raíz para la absorción de agua y nutrientes. Las plantas asociadas con hongos micorrícicos exploran de 10 a 200 veces más volumen de suelo y absorben y transportan hacia la raíz más intensivamente aquellos elementos nutritivos que son poco disponibles para la planta (Hernández y Salas, 2009).

Gran parte de los estudios dedicados al conocimiento de la simbiosis han demostrado que los HMA son capaces de mejorar la adquisición de nutrientes, en especial fósforo, además de conferir a las plantas resistencia o tolerancia a distintos tipos de estrés de origen biótico y abiótico. La simbiosis de hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) es ampliamente reconocida por su capacidad de proteger a las plantas huésped de los efectos adversos de la sequía. Se ha informado que los hongos MA son la forma más predominante de micorrizas y están presentes en el suelo en forma de esporas, hifas, y propágulos (Hameed *et al.*, 2014).

En la asociación simbiótica, el hongo coloniza la raíz de la planta (hospedante) intracelular o extracelularmente. Incrementa el rendimiento en suelos pobres para cultivos agrícolas, restaura la estructura y la fertilidad de suelos dañados y es todo hecho por la asociación de hongos MA que permite que el aire y el agua pasen al suelo. Mejora también el crecimiento de las plantas y la absorción de nutrientes y mejora la tolerancia de las plantas en condiciones de estrés.

Según Smith y Read (2008) en 1996 Wright descubrió las enormes cantidades de una sustancia producida por las hifas de los hongos MA llamada glomalina con varios niveles en diferentes suelos. Los hongos MA forman un papel crucial en la estructura y el desarrollo de nuevos suelos

y también ayuda en la síntesis de carbono en el suelo mediante la producción de glomalina, una sustancia pegajosa. La glomalina es una glicoproteína que forma una capa protectora en hifas de los hongos con el fin de conservar el agua y los nutrientes. Esto también evita que las hifas fúngicas sufran el ataque de patógenos y la descomposición (Smith y Read, 2008).

Por otra parte, los hongos MA no son agentes de control biológico en el verdadero sentido debido a que no ha habido ninguna indicación de que producen cualquiera de los compuestos antimicrobianos contra patógenos potenciales, aunque pueden estimular la producción de otros compuestos; lo que limita el crecimiento de patógenos.

3.7. Interacción Bacteria/Micorriza arbuscular/Patógeno

Como anteriormente se mencionó, existen bacterias capaces de estimular el crecimiento de las plantas a través de interacciones directas o indirectas con las raíces de las plantas y estas han sido clasificadas como PGPR. Además, la mayoría de las raíces de las plantas están colonizadas por hongos micorrízicos y su presencia generalmente estimula el crecimiento de las plantas. Sin embargo, los rasgos benéficos de las bacterias y hongos colonizadores de raíces se han estudiado principalmente por separado. Sólo recientemente se han estudiado los efectos sinérgicos de las bacterias y los hongos micorrízicos con respecto a sus efectos benéficos combinados en las plantas (Artursson *et al.*, 2006).

Varios estudios han demostrado que las raíces emiten compuestos carbonados y señales químicas diferentes en su rizósfera que atraen selectivamente a poblaciones microbianas capaces de metabolizar estas moléculas que se multiplican preferencialmente en la rizósfera. Los exudados de raíz actúan como sustratos, señales y / o antimicrobianos que influyen en la abundancia relativa de taxones microbianos en la rizósfera. Los HMA afectan la cantidad y

calidad de los compuestos carbonados producidos por la planta y transportados en la micorrizósfera, que es la zona de influencia por la micorriza, su comunidad microbiana es diferente al resto, ya que los hongos usan parte de los exudados y así modifican las funciones de la raíz (Fitter *et al.*, 2011).

La inoculación dual incrementa el crecimiento de la planta y/o disminución de la enfermedad en relación con la inoculación de un solo organismo benéfico, debido a un efecto sinérgico. Otros autores consideran que la combinación de organismos utilizados en el biocontrol de patógenos ha demostrado ser más eficiente que el empleo de organismos individuales (Brewer y Larkin, 2005). Particularmente, la interacción íntima que se da entre las PGPR y los HMA contribuye al control biológico de numerosos patógenos transmitidos por el suelo. Esto tiene implicaciones de gran alcance en los sistemas agrícolas y hortícolas en los que se fomenta el uso de métodos de producción más respetuosos con el medio ambiente para reducir la dependencia de los pesticidas dañinos (Dames, 2014).

Vigna radiata (frijol mungo), inoculado con un consorcio de HMA (*G. coronatum*, *G. etunicatum*, *G. constrictum* y *G. intraradices*) y varias cepas de PGPR productoras de fenazina y 2,4-DAPG, fueron investigadas para determinar el efecto sobre el establecimiento de micorrizas. Los compuestos antifúngicos no interfirieron con la simbiosis de los hongos micorrízicos arbusculares, se demostró que una cepa *Pseudomonas fluorescens* productora de DAPG tiene un efecto positivo sobre la colonización micorrízica, casi duplicando el porcentaje de colonización, mientras que una cepa productora de fenazina no mostró efecto significativo (Dwivedi *et al.*, 2009).

Cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae*, todas inoculadas en tomate con *F. oxysporum lycopersici*, mejoraron la adquisición de nutrientes por las plantas (Akköprü y Demir, 2005). Akhtar y Siddiqui (2009) mostraron, en un estudio sobre plantas de garbanzo (*Cicer arietinum*) que la inoculación combinada de *Glomus intraradices*, *Rhizobium* y *Pseudomonas straita* proporcionó un control biológico efectivo y promovió el crecimiento de plantas con pudrición de raíz por *Meloidogyne incognita* y *Macrophomina phaseolina*. Bharardwaj *et al.* 2012 también reportaron que aislados de *Pseudomonas*, una cepa de *Bacillus* y una de *Glomus irregulare* inoculados en cultivo de papa infestado con *Rhizoctonia solani* disminuyeron la enfermedad por medio de la producción de exudados radiculares.

Existen numerosos estudios que muestran los efectos benéficos de las asociaciones y relaciones sinérgicas que se dan entre microorganismos del suelo que prosperan en la zona de la rizósfera como una forma de protección contra microorganismos fitopatógenos y para mejorar el crecimiento de las plantas, favoreciendo la disponibilidad de nutrientes o a través de efectos de tipo hormonal.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en plántulas de chile 'guajillo' (*Capsicum annuum* L.)

4.1.1. Aislamientos microbianos

En mayo de 2014 se realizó un muestreo de suelo rizosférico de maíz (*Zea mays* L.) establecido en un módulo agroforestal localizado en la localidad de La Palma Pegada, perteneciente al municipio de Salinas, S.L.P., cuyas coordenadas son 22°43'08.4"N, 101°48'17.7"W con una elevación de 2222 m. Cabe mencionar que en el espacio donde se realizó el muestreo el cultivo anterior fue chile. Para el aislamiento de las cepas se utilizó la técnica de dilución y siembra en agar nutritivo (Figura 5) a través del siguiente procedimiento: el suelo colectado se colocó en tubos de ensayo con agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriales (hasta 10^{-6}); de cada una de estas diluciones se tomó una alícuota de 0.2 ml, la cual se colocó en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo YPGA (extracto de levadura 5 g L^{-1} , peptona de carne 5 g L^{-1} , dextrosa anhidra 10 g L^{-1} y agar bacteriológico 20 g L^{-1}), los cuales se incubaron a 28°C durante 24 h (Kavitha *et al.*, 2005). Posteriormente se realizó la caracterización morfológica y cultural en un periodo de 24 horas, donde se consideró color, forma, elevación y borde de la colonia.

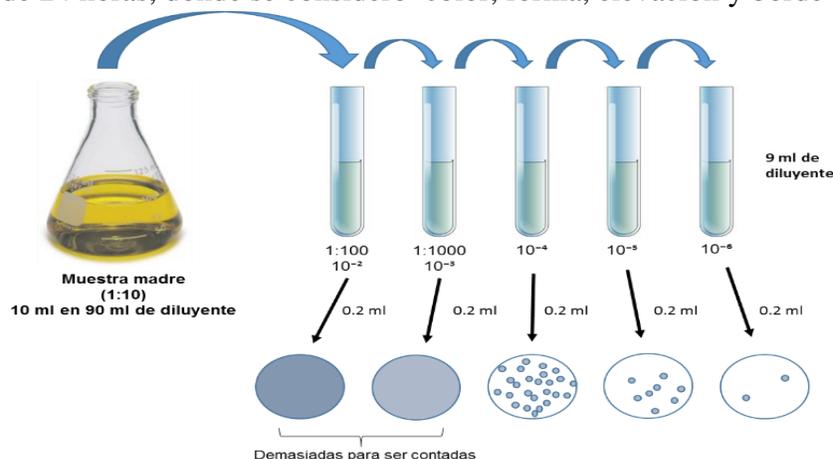


Figura 5. Esquema de la técnica de dilución y siembra en agar nutritivo (elaboración propia).

Por otra parte, en almácigos de plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.) ´guajillo´ ubicados en la comunidad La Dulce Grande (23°00'00.1"N 102°10'29.1"W), municipio de Villa de Ramos, S.L.P., se muestrearon plántulas de chile que presentaban síntomas de damping off, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Agua-Suelo-Planta del Colegio de Postgraduados-Campus San Luis Potosí. Las raíces fueron lavadas y el cuello de la plántula enferma se diseccionó en pequeñas porciones (2 mm de longitud aproximadamente) se colocaron en cajas de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, laboratorios DIBICO) y se incubaron a 28°C durante siete días, tiempo después del cual las colonias fúngicas crecidas se purificaron, obteniendo tres cepas pertenecientes al género *Fusarium* sp. Adicionalmente, en el presente estudio se utilizó una cepa de *Rhizoctonia* sp. proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Las cepas fueron conservadas en PDA.

4.1.2. Antagonismo microbiano *in vitro*

Se realizó la reactivación de los aislamientos bacterianos y fúngicos en los medios de cultivo agar nutritivo y PDA, respectivamente. Para evaluar la actividad antifúngica de 18 aislamientos bacterianos contra cuatro hongos patógenos, se utilizó el método de cultivo dual en cajas Petri ($\emptyset = 8$ cm) conteniendo PDA (Coskuntuna y Özer 2008). Los aislamientos bacterianos de un día de edad fueron colocados a 2 cm de la periferia de la caja Petri haciendo una línea de 2 cm de largo; cada uno por triplicado. Se incubaron a 28°C durante 24 h. Un día después se colocó un disco de 5 mm de diámetro de micelio fúngico a una distancia de 4cm de la bacteria. Los cultivos se incubaron a 28°C, hasta que el control (sin bacteria) llenó la caja. Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición correspondiente a cada una de las cepas bacterianas. El porcentaje de inhibición fue calculado usando la formula propuesta por Mehetre

y Kale (2011) % de inhibición = [1 - (crecimiento fúngico en agar que recibió la suspensión bacteriana/crecimiento fúngico en el control) x 100].

4.1.3. Producción de ácido indolacético (AIA)

Los aislamientos bacterianos fueron reactivados en el medio líquido Luria-Bertani (Bric *et al.*, 1991), modificado de acuerdo a Goswami *et al.* (2014), el cual fue incubado durante 5 días en agitación rotatoria (New Brunswick Scientific Edison) a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se tomaron 2 ml de cada aislamiento y se centrifugó (Centrífuge 5415 C eppendorf) a 8000 rpm; el sobrenadante de cada cultivo fue mezclado con el reactivo Salkowski (Balota *et al.*, 1998) en una relación de 2:1 y se incubó durante 30 min en oscuridad, para evidenciar el desarrollo de color (rosado-violeta). Finalmente, la absorbancia del complejo coloreado se leyó en un espectrofotómetro (Bio Tek Laboratory Instrument, Synergy 2, USA) a 530 nm. La concentración de AIA fue determinada mediante una curva estándar en un rango de 0 a 300 $\mu\text{g/ml}$. Para cada aislamiento se incluyeron tres repeticiones. Se utilizó como referencia el medio de cultivo sin inóculo bacteriano.

4.1.4. Solubilización de fosfato tricálcico insoluble

Se inocularon 18 cepas bacterianas en frascos que contenían 20 ml de medio de cultivo líquido Pikovskaya (Pikovskaya, 1948), el cual contenía fosfato tricálcico insoluble [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] como única fuente de fósforo, y se incubaron durante 7 días a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación constante. Se tomaron 2 ml de cultivo de cada frasco y se centrifugaron a 8000 rpm. El fósforo soluble del sobrenadante se estimó mediante el método colorimétrico azul de molibdeno (Jackson, 1967) a 480 nm. La correspondiente cantidad de fosfato soluble fue calculado de una curva estándar en un rango de 0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r^2=0.99$) a los 7 días del crecimiento del cultivo (Banerjee *et al.*, 2010).

4.2. Identificación molecular de rizobacterias y hongos

Se realizó el aislamiento de ADN genómico de las rizobacterias B7, B8, B9, B14, B15 y B23 y hongos *Fusarium* púrpura, *F. naranja* y *F. amarillo* a partir de cultivo bacteriano en medio agar nutritivo para rizobacterias y PDA para hongos, utilizando el protocolo de extracción CTAB y acetato de Sodio (LaMontagne *et al.*, 2002). El ADN genómico se mandó a amplificar y a secuenciar en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Se amplificó un fragmento del gen 16S rRNA utilizando los oligonucleótidos 533F (Weisburg *et al.*, 1991) y 1391R (Turner *et al.*, 1999) en el termociclador Verity para PCR punto final (Applied Biosystems). Los productos obtenidos se secuenciaron con el método de dideoxinucleótidos marcados en el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El porcentaje de identidad de las secuencias del fragmento del gen 16S rRNA con las cepas tipo se determinó al utilizar BLASTN de la base de datos del GenBank.

4.3. Efecto de la inoculación de cepas bacterianas sobre la supervivencia de plántulas de chile tipo 'guajillo' inoculadas con agentes causales del damping off

Se realizó la siembra de semilla de chile 'guajillo' en un sustrato de peat moss+vermiculita en una relación 1:1 previamente esterilizado dos veces a 121°C durante 1 hora, con un intervalo de 3 días entre ambas esterilizaciones. Siete días después de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a charolas de unicel. Se dio un periodo de cinco días para la aclimatación de las plántulas y enseguida se procedió a realizar la inoculación con 1 mL de cultivo bacteriano conteniendo (10^9 células mL⁻¹) de cada cepa bacteriana (B7, B9, B15 y B23) seleccionadas del estudio *in vitro*. El inóculo bacteriano se aplicó con una micropipeta en la base del tallo de las plántulas. Se dio un intervalo de 4 días para realizar la inoculación del hongo patógeno (Hassan

et al., 2015); el micelio fúngico provino de un cultivo de 7 días de edad y se colocó a nivel de las raíces (Figura 6).

La supervivencia de las plántulas se registró durante 60 días con el fin de identificar el tratamiento con mayor número de plantas supervivientes atribuido a la bacteria antagonista inoculada frente a cada hongo fitopatógeno.



Figura 6. Inoculación del patógeno con dos discos de micelio fúngico.

4.4. Evaluación del efecto de rizobacterias y micorrizas sobre el crecimiento de plántulas de *Capsicum annuum* L. tipo 'guajillo' inoculadas con hongos patógenos.

Con base en los resultados obtenidos de la caracterización *in vitro* de rizobacterias promotoras del crecimiento, se seleccionaron las cepas B8 y B14 para evaluar su efecto e interacción con el consorcio de hongos arbusculares *Glomus* spp. Zac-19 sobre el crecimiento de plántulas de chile guajillo inoculadas con hongos patógenos causantes del damping off.

4.4.1. Material vegetal, bacteriano y fúngico

Se utilizó semilla de *Capsicum annuum* L. tipo 'guajillo', la cual fue proporcionada por productores de Villa de Ramos, S.L.P. La semilla fue desinfectada durante 5 min en alcohol al 70% y posteriormente en cloro comercial al 10% durante 15 min. Una vez desinfectadas, las

semillas fueron sembradas en charolas de unicel, las cuales contenían en cada orificio 6 g del sustrato descrito en el apartado 4.3. Siete días después de la emergencia las plántulas fueron inoculadas con 1 mL de cultivo bacteriano de los aislamientos B8 y B14 (como se describe en el punto 4.3) y 5 g del consorcio *Glomus* spp. Zac-19 en los tratamientos con micorriza como lo describe Chamizo *et al.* (2009). Cabe mencionar que dicho consorcio fúngico contiene las morfoespecies *Glomus claroideum*, *G. diaphanum*, *G. albidum* y fue proporcionada por el Dr. Alejandro Alarcón del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y previamente fue propagado en sorgo utilizando como sustrato una mezcla de suelo arena en una relación 2:1 la cual fue esterilizada en tres tiempos a 121°C con duración de una hora. Cuatro días después de esta inoculación, las plántulas se inocularon con el patógeno, se aplicaron en cada plántula dos discos de micelio fúngico de 5 mm de diámetro de cada uno de los hongos patógenos *Fusarium* púrpura, *F. amarillo*, *F. naranja* y *Rhizoctonia* sp.

Cabe mencionar que con la finalidad de evitar contaminación de los patógenos utilizados dentro del invernadero, las charolas se colocaron sobre recipientes de plástico (45 x 30 cm aprox.

Figura 7).



Figura 7. Dispositivo experimental utilizado.

4.4.2. Diseño de tratamientos

En el Cuadro 2 se presentan los tratamientos estudiados, cada uno de los cuales constó de tres repeticiones y se utilizó un diseño experimental completamente al azar. En total se evaluaron ocho tratamientos con tres repeticiones dando un total de 24 unidades experimentales. Cabe mencionar que este arreglo de tratamientos se realizó para cada hongo patógeno. Además de un testigo absoluto para todos los tratamientos.

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar la promoción del crecimiento por bacterias y su interacción con hongos micorrízicos.

	Con hongo patógeno			
	Sin hongo micorrízico		Con hongo micorrízico	
	Sin B14	Con B14	Sin B14	Con B14
Bacteria				
Sin B8	0-0-0-y	a-0-0-y	0-0-x-y	a-0-x-y
Con B8	0-b-0-y	a-b-0-y	0-b-x-y	a-b-x-y

Los ceros son ausencia del microorganismo y las letras son la presencia del microorganismo.

Clave: a-b-x-y. a=B14; b=B8; x=Zac-19; y=Patógeno.

Adicionalmente, se comparó la inoculación dual B23/micorriza en plántulas infectadas o no por los hongos patógenos en estudio (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos para evaluar la promoción del crecimiento por medio del antagonismo de B23.

Tratamiento	<i>Fusarium</i> púrpura	<i>F.</i> naranja	<i>F.</i> amarillo	<i>Rhizoctonia</i> sp.
T1	B23+MA+FP	B23+MA+FN	B23+MA+FA	B23+MA+R
T2	B23+MA-FP	B23+MA-FN	B23+MA-FA	B23+MA-R

4.4.3. Condiciones de crecimiento de las plántulas

Las plántulas se desarrollaron bajo condiciones de invernadero durante dos meses (15 mayo-15 junio 2016), a una temperatura máxima de 30°C y mínima de 10°C aproximadamente. Cada plántula fue irrigada con 50 ml de solución nutritiva Long Ashton 50% de fósforo (Hewitt, 1966), con un espaciamiento entre riegos de 3 días. La temperatura al interior del invernadero, se controló mediante la activación de un muro húmedo y humedecimiento del piso.

4.4.4. Variables evaluadas

Después de dos meses de cultivo se realizaron las siguientes determinaciones:

Altura de la planta (cm) se determinó midiendo longitudinalmente desde la base hasta el ápice. Con el fin de obtener la curva de crecimiento del cultivo se realizaron mediciones semanales, durante un período de 49 días. En total se realizaron ocho mediciones de altura de la planta. Posteriormente, se determinaron las curvas de crecimiento mediante los modelos lineal y polinómico.

Peso seco parte aérea de la plántula (g), para lo cual se utilizó una balanza electrónica (VELAB balance, modelo VE-1000).

Fósforo y Nitrógeno foliar

El análisis químico realizado a las muestras de material vegetal se realizó en el Laboratorio de Ciencias Ambientales COLMERN A.C. Se determinó el fósforo y nitrógeno foliar total acumulado en la materia seca. El cálculo se realizó mediante la digestión con HNO₃-HClO₄ 2:1 para P y digestión con H₂SO₄-Ácido salicílico para N de cada uno de los tratamientos, esto con la finalidad de observar la estimulación de la micorriza en la absorción de estos nutrientes por las plantas.

Porcentaje de colonización micorrízica total (%CMT) Las raíces de las plántulas inoculadas con el consorcio *Glomus* Zac-19 fueron clareadas y teñidas con azul de tripano de acuerdo a la metodología propuesta por Phillips y Hayman (1970). Posteriormente, segmentos de raicillas teñidas se montaron en laminillas y se realizó su observación en el microscopio, En cada campo se determinó campos negativos y positivos. En los campos positivos se contabilizaron las estructuras fúngicas (hifas, vesículas y arbusculos). El porcentaje de colonización en raíces se calculó con la siguiente fórmula propuesta por Sieverding (1983):

$$\%CMT = (\text{número de segmentos colonizados/número de segmentos totales}) \times 100$$

El **número total de esporas** en 100g de suelo, se contabilizó después de su extracción por el método de Gerdemann y Nicolson (1963).

4.5. Análisis estadístico

El comportamiento de las bacterias en la inhibición del crecimiento de hongo, la producción de ácido indolacético así como la solubilización de fósforo como reflejo de la actividad para reducir el Damping of fueron analizados identificando diferencias (al 95% de confiabilidad), después de identificar las fuentes de variación relevantes utilizando InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

Las variables evaluadas peso seco, número de esporas, colonización micorrízica, concentración de fosforo y nitrógeno foliar se analizaron con un análisis de varianza al 95% de confiabilidad.

La altura de plántula se analizó con dos modelos de crecimiento, los cuales fueron el lineal y polinómico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.).

5.1.1. Aislamientos microbianos

En total se aislaron 50 cepas de rizobacterias, de las cuales se seleccionaron 18 tomando como criterio su velocidad de crecimiento en un período de 24 horas. Con base en sus características morfológicas macroscópicas las cepas B4, B6, B7, B8, B9, B11, B14, B15, B17 y B20 pueden pertenecer al género *Pseudomonas*, estas características se evidenciaron por abundante crecimiento en el medio de cultivo King B, propio para este género y en el cual hubo una alta producción de pigmentos verdes y amarillos. Las cepas B3, B5, B10, B13, B21, B22, B23 y B24 pueden corresponder al género *Bacillus* dadas sus características de coloración de la colonia.

La descripción morfológica de las cepas se presenta en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características morfológicas de 18 aislamientos bacterianos provenientes de la rizósfera de maíz bajo manejo agroforestal.

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Color
B3	Circular	Ondulado	Elevada	Lisa	Creмоса	Crema c/centro café
B4	Circular	Entero	Plana	Lisa	Membranosa	Amarillo verdosa
B5	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Crema
B6	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarillo claro
B7	Fusiforme	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarilla
B8	Circular	Lobulado	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarillo-crema
B9	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Creмоса	Naranja difusible
B10	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Rosa fuerte
B11	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarillo verdoso
B13	Circular	Ondulado	Convexa	Lisa	Creмоса	Crema
B14	Fusiforme	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Crema-verde
B15	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Crema-verdosa
B17	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarillo verde
B20	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarillo claro
B21	Rizoide	Filamentosa	Plana	Rugosa	Creмоса	Crema
B22	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Amarillo claro
B23	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Creмоса	Blanco transparente
B24	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Creмоса	Crema

Por otra parte, se aislaron tres cepas fúngicas provenientes de plántulas de Chile, las cuales pertenecen al género *Fusarium* sp. (Figura 8), con base en su pigmentación del medio de cultivo y del micelio se les asignó la nomenclatura FP, FN y FA (*Fusarium* púrpura, *F.* naranja, y *F.* amarillo, respectivamente).

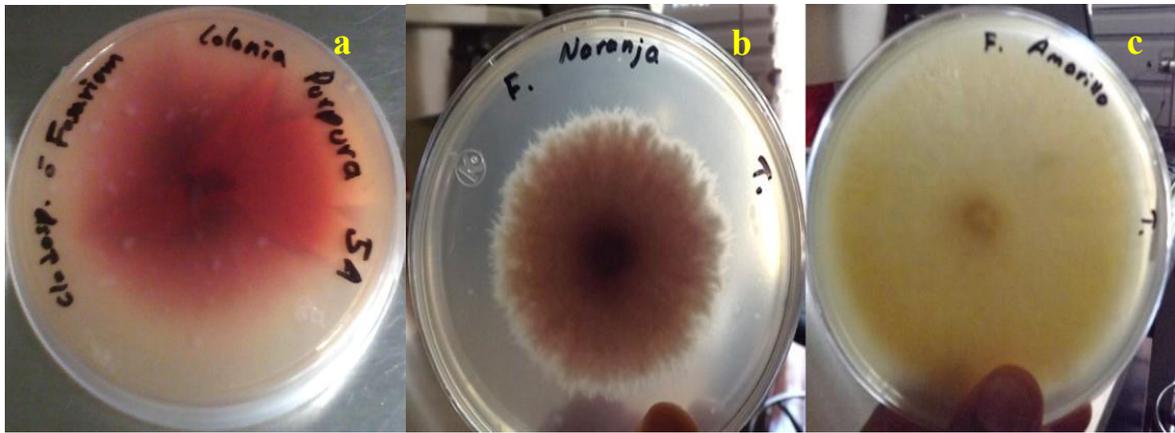


Figura 8. Aislamientos fúngicos provenientes de plántulas de chile ‘guajillo’ que presentaban sintomatología de marchitez fúngica o secadera temprana. a) *Fusarium* púrpura, b) *F. naranja* y c) *F. amarillo*.

5.1.2. Determinación del antagonismo microbiano *in vitro*

Los resultados obtenidos en cultivo dual mostraron que la cepa B23 fue estadísticamente la más eficiente, al inhibir el crecimiento micelial de FP (50.02%); FN (44.05%); FA (46.67%) y R (55.56%) (Figura 9). Estos resultados son similares a los reportados por Ríos-Velasco *et al.* (2016), quienes reportan un porcentaje de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* del 42.0 y 51.5% por efecto de *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* respectivamente; así como los encontrados por Mojica-Marín *et al.* (2009), al confrontar *F. oxysporum* con las cepas de *B. thuringiensis* GM-23 (43.02%) y HD-121 (42.04%) y observaron porcentajes de inhibición más altos para *R. solani* por efecto de las cepas GM-64 (66.66%) y HD-203 (65.99%). Por su parte, Trivedi *et al.* (2008), al evaluar *in vitro* la actividad antagónica de *Pseudomonas corrugata* sobre el crecimiento de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, reportan valores del 58 y 49%, respectivamente. Djordjevic *et al.* (2011), al evaluar 16 aislamientos bacterianos como antagonistas de *F. oxysporum*, reportan un porcentaje de inhibición más alto (70.98%) sobre el crecimiento de este hongo con la cepa Ab23, pero resultados similares a los

encontrados en el presente estudio con los aislamientos Ab9 (59.74%), Ab17 (57.7%) y Ab1 (56.6%).

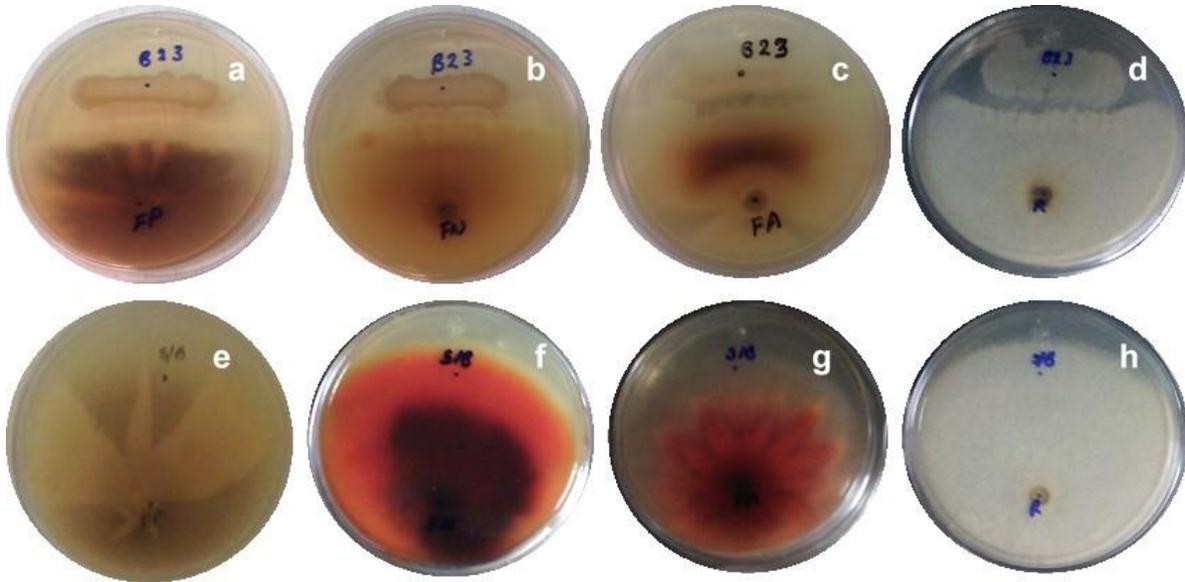


Figura 9. Efecto de la cepa B23 sobre la inhibición del crecimiento de cuatro hongos patógenos. a) *Fusarium* púrpura; b) *Fusarium* Naranja; c) *Fusarium* amarillo y d) *Rhizoctonia* sp. Con sus respectivos testigos (e, f, g y h).

Por otra parte, en la figura 10a se puede observar que las cepas B6; B13; B11; B22; B15; B9; B17 y B7 ejercen un efecto antagónico estadísticamente igual sobre *Fusarium* púrpura (FP), pero diferente al resto de las cepas bacterianas estudiadas. Al contrastar las 18 cepas bacterianas con *Fusarium* naranja (FN) se encontró que las cepas B23 y B9 presentaron un porcentaje de inhibición superior al 44%, que fue superior al resto de los tratamientos (Figura 10b).

Mientras que las cepas B7 y B15 inhibieron el crecimiento fúngico de *Fusarium* amarillo (FA), en un 30%, siendo significativamente diferentes ($p < 0.05$) al resto de los otros tratamientos (Figura 10c). Por otra parte, se encontró un porcentaje de inhibición del 47.7, 42.2 y 35.5% al

confrontar las cepas B7, B15 y B14 respectivamente, con *Rhizoctonia* sp., siendo estadísticamente iguales (Figura 10d).

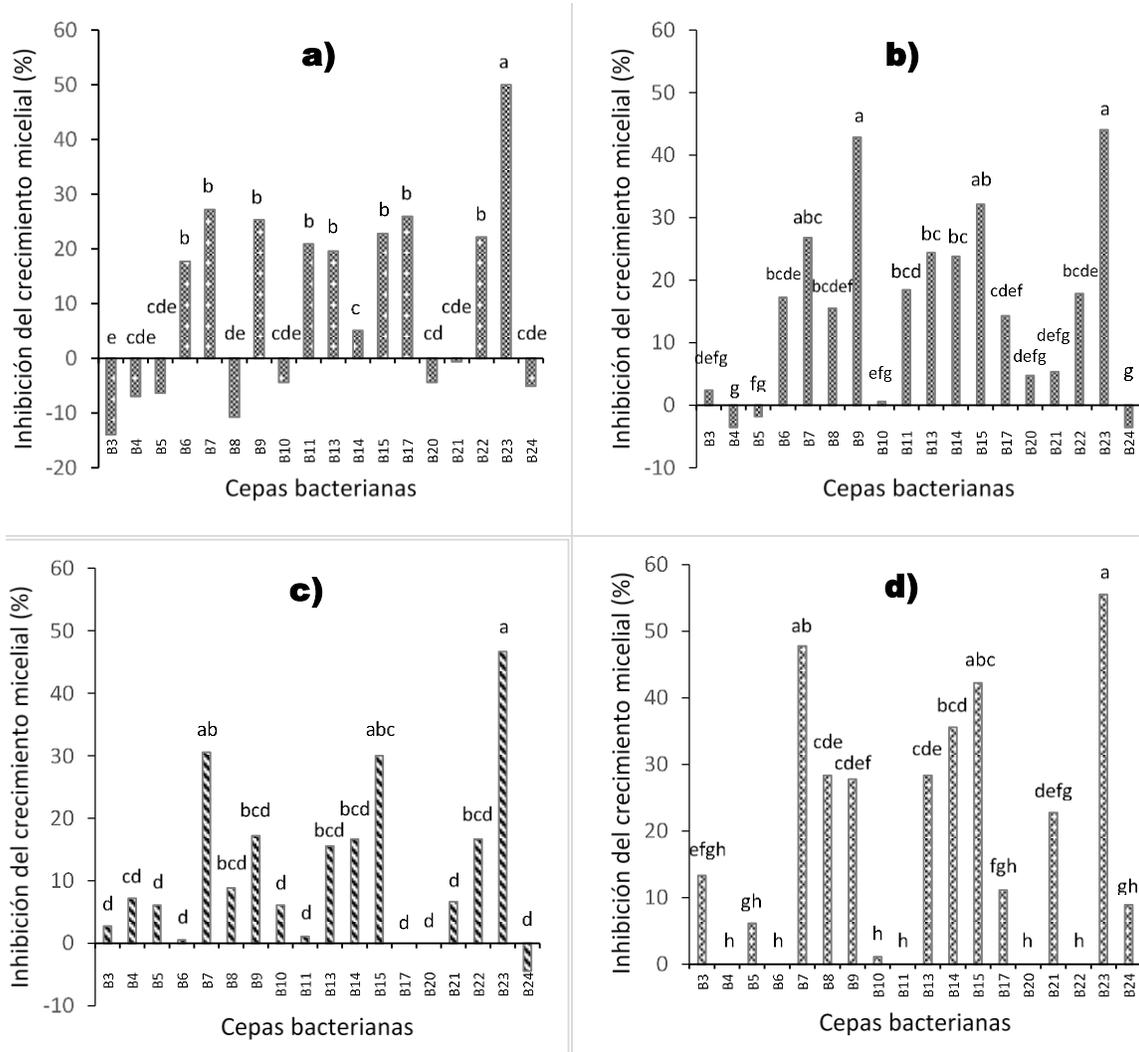


Figura 10. Efecto de 18 cepas bacterianas sobre el crecimiento micelial de cuatro hongos fitopatógenos: a) *Fusarium* púrpura, b) *Fusarium* naranja, c) *Fusarium* amarillo y d) *Rhizoctonia* sp.

Finalmente, las cepas B3, B4, B5, B10, B20 y B24 no tuvieron ningún efecto inhibitorio en los cuatro fitopatógenos estudiados, lo cual indica que estas cepas no fueron capaces de producir una cantidad suficiente de sustancias que puedan inhibir el crecimiento de los patógenos, por lo

que no se alcanza un umbral que les permita exhibir una respuesta antagónica (Figueroa-López *et al.*, 2016); o bien el antibiótico producido no fue eficiente.

Está bien documentado que el efecto antagónico de las rizobacterias sobre la inhibición del crecimiento de fitopatógenos es debido a la síntesis de metabolitos secundarios (Santoyo *et al.*, 2009; Khannous *et al.*, 2014); Trivedi *et al.* (2008) demostraron que metabolitos volátiles producidos por *Pseudomonas corrugata* juegan un papel predominante en la inhibición de los hongos *F. oxysporum* y *A. alternata*, mientras que los metabolitos difusibles solo tienen un rol secundario. Por otra parte, se ha demostrado que algunas especies de *Pseudomonas* producen enzimas líticas, las cuales pueden romper las membranas celulares de algunos hongos fitopatógenos; las más conocidas son: quitinasas, celulasas, proteasas y β -glucanasas 1,3 (Compant *et al.*, 2005).

5.1.3. Producción de ácido indolacético

La producción de ácido indolacético (AIA) es una propiedad de las rizobacterias para estimular y facilitar el crecimiento vegetal (Mohite, 2013). Esta auxina es un producto derivado del metabolismo del L- triptófano producido por varios microorganismos del suelo, incluyendo las PGPR (Goswami *et al.*, 2015). En el presente trabajo, se observó la síntesis de este regulador del crecimiento en 18 aislamientos bacterianos provenientes de la rizósfera de maíz, con una variación entre el 1.3 a 11.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La producción de AIA significativamente más alta ($P \leq 0.05$) correspondió a B14 y las más baja a B4 (Figura 11). Estos resultados concuerdan con los reportados en varias investigaciones, donde se evaluó la producción de AIA en cepas bacterianas provenientes de la rizósfera de maíz. Noh *et al.* (2014) encontraron que cepas aisladas de maíz promediaron en 3.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA. Por su parte, Josic *et al.* (2012) señalan

que al adicionar 5mM de triptófano al medio líquido King B, la concentración de AIA se incrementó de 8.6 a 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en la cepa Q4m (*Pseudomonas* sp.). Se ha observado que la producción de AIA por rizobacterias varía entre diferentes especies y cepas, y que está influenciada por las condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento y la disponibilidad de sustrato (Mirza *et al.*, 2001).

De acuerdo a la producción de AIA *in vitro*, las rizobacterias se pueden dividir en tres grupos: bajas productoras de auxinas (1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), medianas productoras (11 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y altas productoras (21 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA) (Khalid *et al.*, 2004; Rojas *at al.*, 2010). Si bien la mayoría de las cepas de este estudio produjo baja cantidad de ácido indolacético, no todas las bacterias que producen alta cantidad de AIA estimulan el crecimiento de las plantas (Noh *et al.* 2014). Por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* produce hasta 78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, lo cual induce el desarrollo de la enfermedad conocida como "agalla de la corona", cuyos síntomas son tumores en raíces, tallos y ramas en diversas especies vegetales (Lara *et al.*, 2011). Mientras que consideraciones mas bajas (1.1 a 12.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) incrementaron el crecimiento de trigo *in vitro* (Khalid *et al.*, 2004).

Ramírez y Ochoa-Alejo (1996) en un estudio *in vitro* demostró que el AIA tiene un efecto sobre la inducción y crecimiento de brotes adventicios del cultivo de chile siendo su concentración la que determina el tipo de respuesta. Peña *et al.* (2016) reportan una producción de AIA entre 4.0 a 24.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en cinco especies de *Bacillus*, lo cual es suficiente para promover el crecimiento de *C. annuum* L. Por lo anterior, en el presente estudio ocho cepas pueden considerarse promisorias para promover el crecimiento del cultivo de chile.

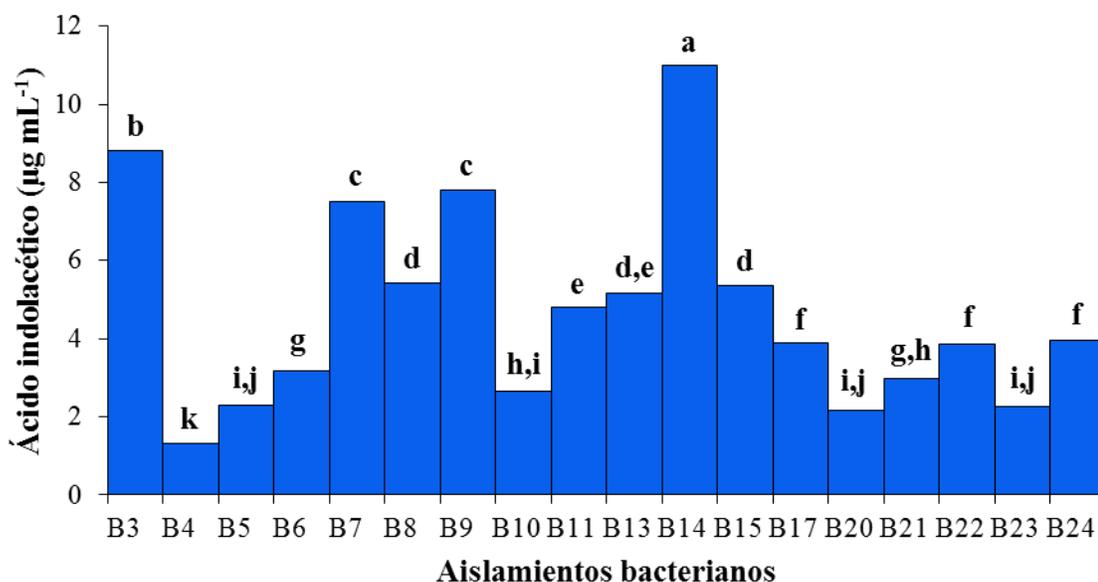


Figura 11. Producción de ácido indolacético de 18 aislamientos bacterianos provenientes de la rizósfera de maíz. Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, 0.05).

5.1.4. Solubilización de fosfato tricálcico insoluble

Se evaluó la capacidad de 18 aislamientos bacterianos para solubilizar fósforo inorgánico (Pi) en el medio de cultivo líquido de Pikovskaya, el cual contenía $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ insoluble como única fuente de fósforo. Después de un periodo de incubación de 7 días a 25°C en agitación constante, se determinó la cantidad de fosfato disuelto en el medio de cultivo, el cual varió entre los diferentes aislamientos (Figura 12). La cepa B8 solubilizó la cantidad significativamente más alta de Pi (100.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$), con respecto a las otras cepas. Con B14 se registraron 80.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$, siendo estadísticamente diferente a la registrada con B17 y B21 (60.67 y 56.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). La cantidad de fosfato solubilizado por el resto de las cepas, con excepción de B10 y B9 (efecto nulo), se encuentra en el rango de 2.21 a 49.12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los resultados registrados en las cepas B8, B14 y B17 son superiores a los reportados por Nautiyal (1999), quien estandarizó el método para determinar la solubilización de fosfato. En ese estudio se

reporta que la cepa más eficiente fue *Pseudomonas* sp. 2 con $35 \mu\text{g mL}^{-1}$, *Pseudomonas* sp. 1 ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$), *P. fluorescens* ($13 \mu\text{g mL}^{-1}$), *P. aerogenes* ($14 \mu\text{g mL}^{-1}$), *P. aeruginosa* ($14 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Bacillus polymyxa* ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$), *B. subtilis* ($11 \mu\text{g mL}^{-1}$) y *Bacillus* sp. 1 ($17 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por otra parte, Sourav y Chayanika (2016) reportan que la máxima cantidad de fosfato solubilizado por *Pseudomonas aeruginosa* fue de $0.176 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se ha señalado que las bacterias solubilizan el Pi por medio de la producción de CO_2 , ácidos orgánicos, excreción de protones y asimilación de NH_4^+ . El mecanismo más importante de solubilización de fosfato de calcio es la acidificación por medio de la biosíntesis y secreción de ácidos orgánicos (Paredes y Espinosa, 2009). Tales ácidos orgánicos pueden directamente disolver el Pi como resultado del intercambio de aniones de fosfato mediante un anión ácido o a bien quelatar los iones de Fe, Al y Ca asociados con P (Omar, 1998) y en consecuencia se incrementa la biodisponibilidad de P, que puede ser aprovechado por los cultivos o la flora silvestre presente.

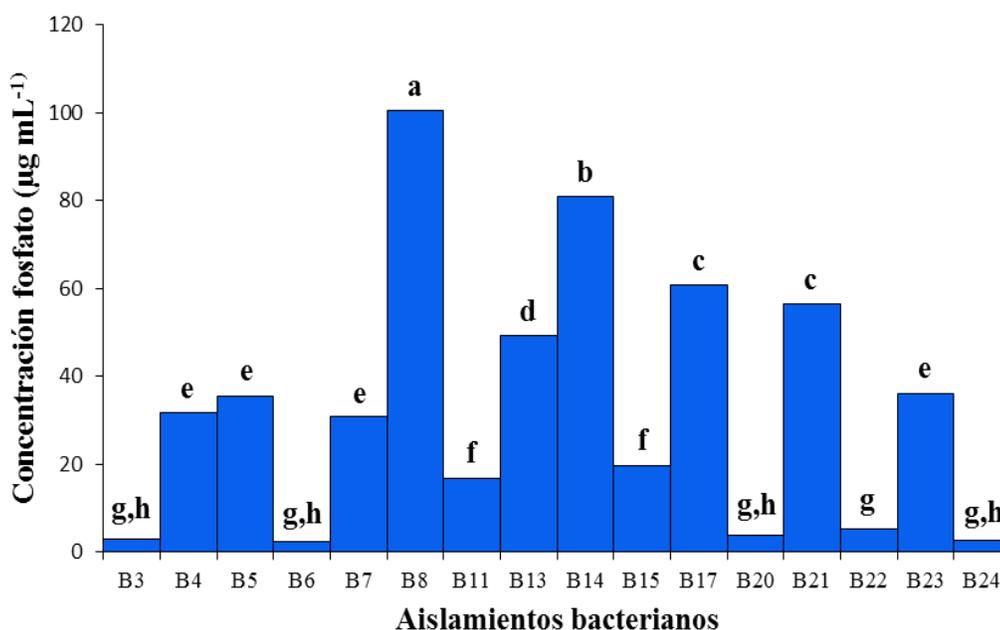


Figura 12. Concentración de fosfato solubilizado por aislamientos bacterianos. Columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, 0.05).

5.2. Identificación molecular de rizobacterias y hongos

Los aislados B8 y B9 se identificaron como *Pseudomonas chlororaphis*; B7 y B14 como *Pseudomonas* sp. y B15 como *Pseudomonas protegens*. Por su parte, B23 fue identificado como *Bacillus* sp. Todos presentaron una identidad del 99%, con una cobertura del 100%. El género *Pseudomonas* está compuesto por bacterias gram negativas, que pertenecen a las γ -Proteobacteria, se encuentran distribuidas en una amplia diversidad de ambientes y son conocidas por su versatilidad metabólica en la utilización de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de energía (Lessie y Phibbs, 1984; Wu *et al.*, 2011); y en la producción de diversos metabolitos secundarios (Gross y Loper *et al.*, 2009). *Pseudomonas* es uno de los grupos bacterianos más complejos, con más de 100 especies descritas hasta el momento, en el cual hay la presencia de grupos y subgrupos. El grupo de *Pseudomonas fluorescens* contiene varias especies (*P. brassicacearum*, *P. protegens*, *P. chlororaphis* y *P. fluorescence*), descritas como PGPR por su habilidad para suprimir patógenos causantes de enfermedades (Raajimakers *et al.*, 2009) y producir antibióticos o metabolitos secundarios (Gross y Loper *et al.*, 2009) que las hacen muy viables para aplicaciones biotecnológicas (Saravanakumar *et al.*, 2008). La identificación bacteriana a través del gen 16S ribosomal ha sido ampliamente utilizada; sin embargo, es bien sabido que especies bacterianas cercanas no pueden ser diferenciadas mediante el uso de este gen debido a su alta tasa de conservación (Fox *et al.*, 1992; Kämpfer y Glaeser, 2012), por lo que se ha propuesto el empleo del análisis de secuencias multilocus mediante el uso de otros genes como marcadores moleculares: *rpoB*, *rpoD*, *gyrB* (Yamamoto *et al.*, 2000; Ait-Toyeb *et al.*, 2005), permitiendo la identificación hasta el nivel de especie. En este trabajo, al utilizar el gen 16S rRNA como único marcador molecular, permitió designar hasta nivel de género los aislados obtenidos, los cuales pertenecen a *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Miembros de estos géneros han sido reportados como PGPR, con diferentes mecanismos como producción de fitohormonas, supresión de patógenos o productoras de metabolitos secundarios de interés biotecnológico.

Por otra parte, los aislamientos fúngicos FP y FN corresponden a *Fusarium* sp.; el primero con 93% de identidad y cobertura del 84% y el segundo con 86% de identidad y 80 de cobertura. *F. amarillo* corresponde a un hongo no cultivado, con un 94% de identidad y 33 % de cobertura. *Fusarium* sp. pertenece a la familia *Nectriaceae*. El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas (Tapia y Amaro, 2014). Santos (2010) menciona a *Fusarium* sp. como uno de los principales agentes causales de la marchitez del chile que disminuye el rendimiento del cultivo.

5.3. Efecto de la inoculación de cepas bacterianas sobre la supervivencia de plántulas de chile tipo 'guajillo' inoculadas con agentes casuales del damping off

Bajo condiciones de invernadero se realizó un experimento cuyo objetivo fue evaluar el efecto de las cepas *Pseudomonas* sp. B7; *Pseudomonas chlororaphis* B9; *Pseudomonas protegens* B15 y *Bacillus* sp. B23 sobre la supervivencia de plántulas de chile inoculadas con *Fusarium* sp. (FN; FA; FP; FN) y *Rhizoctonia* sp. (R).

En la Figura 13 (a, b y d), se observa a los ocho días el 100% de supervivencia en plántulas inoculadas con *Bacillus* sp. B23 y una supervivencia en las plantas control de FP; FA y R del 80, 77.8 y 83%, respectivamente (solo inoculadas con el patógeno). La supervivencia de 100% lograda por *Bacillus* sp. B23 a los ocho días coincide con lo reportado por Abdel-Monaim (2013) quien obtuvo un 72% y 76.34% de supervivencia por *Bacillus megaterium* en plantas de

frijol en dos estaciones diferentes, cuyas plantas estaban infestadas con los patógenos *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *M. phaseolina* causándole damping off a la planta. En este mismo período, también se observa el 100% de supervivencia al inocular *Pseudomonas chlororaphis* B9; *Pseudomonas protegens* B15 para el caso de FP; *Pseudomonas protegens* B15 para el caso de R. En la Figura 13a, se observa que de 34 a 60 días existe una disminución en la supervivencia de las plántulas control en comparación con las plántulas inoculadas con rizobacterias.

Por otra parte, solo las cepas *Pseudomonas* sp. B7 y *Bacillus* sp. B23 presentan un efecto sobre la sobrevivencia de plántulas infectadas por FA hasta los 55 días (Figura 13b).

Con respecto, al hongo FN (Figura 13c), tanto en plántulas control como en las plántulas inoculadas con *Pseudomonas* sp. B7 y *Bacillus* sp. B23, se registró el 100% de supervivencia. El efecto de *Pseudomonas* sp. B7 con 100% de supervivencia hasta los 55 días concuerda con lo reportado por Navarro *et al.* (2016), quienes obtuvieron una supervivencia del 98% en *H. almeriense* en nivel de plántula; cabe señalar que estas plántulas no estaban infectadas por patógenos. Esta misma tendencia se mantiene hasta los 34 días para el caso de plántulas control y las inoculadas con B7. El comportamiento de las plántulas control puede ser debido posiblemente a que la cantidad de micelio fúngico no fue suficiente para que este hongo exprese virulencia en los primeros 34 días, o bien a que su efecto para causar la enfermedad sea más tardío que los otros patógenos utilizados en el presente estudio.

Finalmente, para el caso de *Rhizoctonia* sp., solo *Pseudomonas* sp. B7 presentó un efecto sobre la supervivencia de las plántulas, debido a que ésta fue del 80% hasta los 55 días, mientras que en las plántulas control fue del 41.4% (Figura 13d). Al respecto, Toppo y Tiwari (2015) reportan una variación en la supervivencia plántulas de tomate de 30 días infectadas con

Rhizoctonia, la cual varió entre el 93.33 al 46.67 % al inocular *Pseudomonas alcaligenes* PKJ25 y *Pseudomonas* PKS10. En el presente estudio, a los 34 días la mayor supervivencia fue del 83.3% y la menor del 46.2% al inocular *Pseudomonas* sp. B7 y *Bacillus* sp. B23 respectivamente.

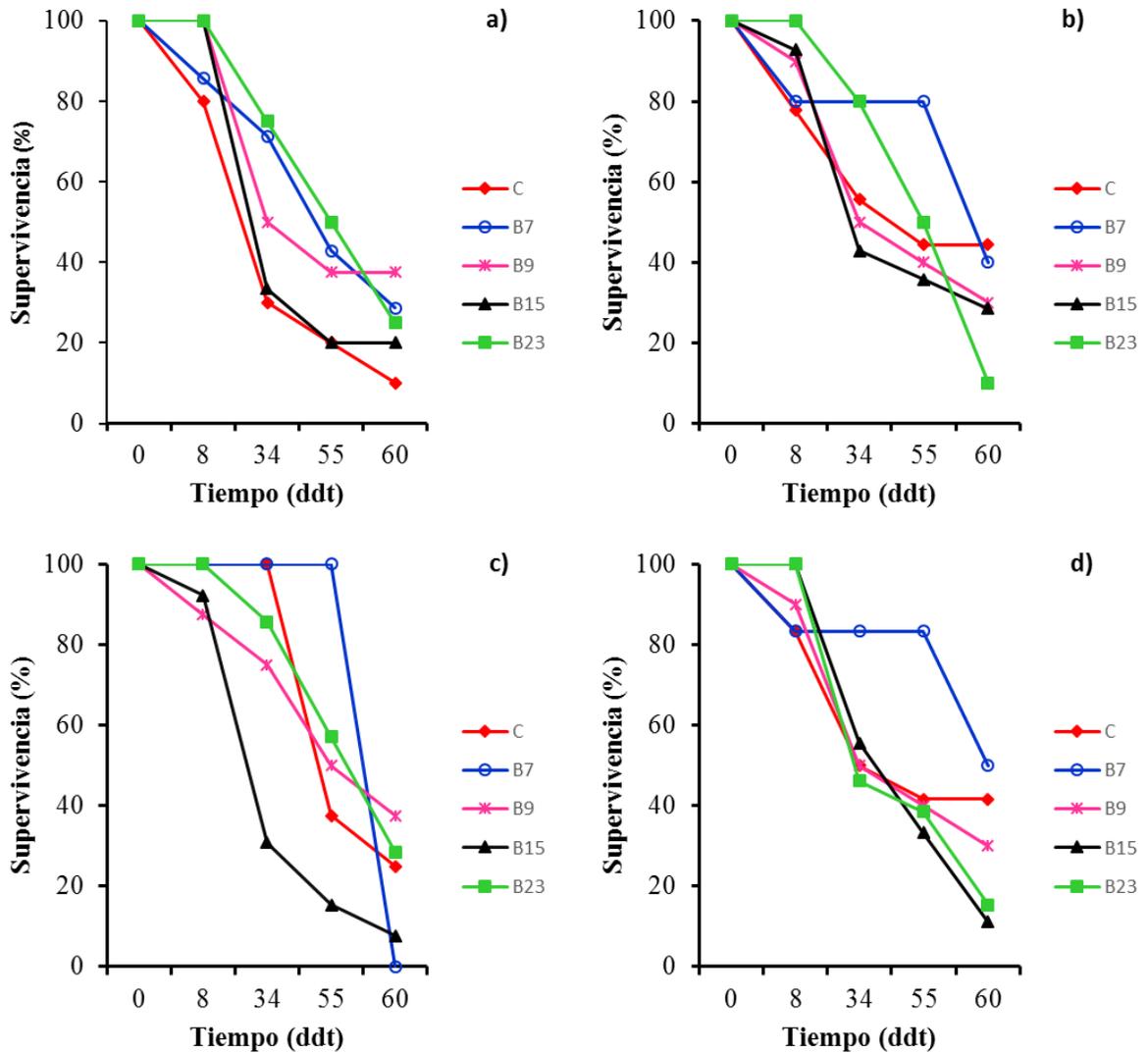


Figura 13. Efecto de cuatro bacterias antagonistas en la supervivencia de plántulas de chile 'guajillo' inoculadas con diferentes hongos fitopatógenos. a) *Fusarium* púrpura; b) *F. amarillo*; c) *F. naranja* y d) *Rhizoctonia* sp.

5.4. Evaluación del efecto de rizobacterias y micorrizas sobre el crecimiento de plántulas de *Capsicum annuum* L. tipo 'guajillo' inoculadas con hongos patógenos

5.4.1. Altura de la planta

5.4.1.1. Curvas de crecimiento

Los mejores modelos se seleccionaron por un coeficiente de determinación $R^2 > 0.70$. Los modelos de mejor ajuste fueron los polinomiales de segundo grado de acuerdo a la expresión $Y = cx^2 \pm bx \pm a$, donde Y es la variable dependiente (altura de la planta) y X es la variable independiente (días después del trasplante, ddt).

Los máximos incrementos en altura por día se presentaron en los tratamientos Bs B23 + M + R y Bs B23 + M + FA con 0.363 y 0.356 cm día⁻¹ respectivamente; los demás tratamientos muestran un incremento de 0.2 cm día⁻¹ en promedio. A cada ecuación se agregó la intersección (termino independiente) la cual es el promedio de las tres plantas al inicio del experimento. Utilizando la ecuación del modelo de ajuste, los tratamientos Ps B14 + FN, Bs B23 + M + R y Bs B23 + M + FA presentaron mayor velocidad de crecimiento según el termino lineal de la ecuación (0.3398x, 0.3173x, 0.3057x, respectivamente) con una r^2 de 0.9673, 0.7393 y 0.8288, respectivamente. Por el contrario Bs B23 + M + FP presentó un crecimiento lento en comparación con el resto (0.0901x) con $r^2 = 0.9794$ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Ecuaciones de regresión para los valores de altura de los 11 mejores tratamientos con base en su incremento en cm por día.

Tratamiento	Ecuación	R ²	Incremento por día (cm)
Ps B14 + FP	$y = 0.0002x^2 + 0.2084x + 1.5$	0.9646	0.215
Ps B14 + FN	$y = -0.0013x^2 + 0.3398x + 1.66$	0.9673	0.274
Ps B14 + FA	$y = -0.001x^2 + 0.2761x + 1.73$	0.9312	0.227
Ps B14 + R	$y = -0.0002x^2 + 0.2306x + 1.6$	0.9327	0.223
Bs B23 + M + FP	$y = 0.0024x^2 + 0.0901x + 0.8$	0.9794	0.199
Bs B23 + M + FN	$y = 0.0004x^2 + 0.1999x + 1.96$	0.9244	0.215
Bs B23 + M + FA	$y = 0.0012x^2 + 0.3057x + 1.96$	0.7393	0.356
Bs B23 + M + R	$y = 0.0011x^2 + 0.3173x + 2.5$	0.8288	0.363
Bs B23	$y = 0.0026x^2 + 0.1505x + 1$	0.9977	0.280
Ps B14	$y = 9E-06x^2 + 0.2664x + 2.26$	0.9475	0.263
Testigo absoluto	$y = 0.0005x^2 + 0.2307x + 1.43$	0.8365	0.252

Ps: *Pseudomonas* sp. B14, Bs: *Bacillus* sp. B23, M: consorcio *Glomus* Zac-19, FP: *Fusarium*

púrpura, FN: *F. naranja*, FA: *F. amarillo* y R: *Rhizoctonia* sp.

Debido a que el chile, como lo mencionan Azofeifa y Moreira (2004), es un cultivo de manejo intensivo del cual hay muy poca información local sobre análisis del crecimiento y fenología de la planta, no diferencia claramente la fase de crecimiento rápido debido a que éste solo se midió durante 49 días. Rylski (1986) menciona que en la curva de crecimiento de la planta de chile se distinguen 3 etapas: la primera es una fase inicial o logarítmica, donde la planta joven cuenta con un área foliar y un sistema radical reducido. La segunda, una fase vegetativa o exponencial donde el crecimiento es rápido y el poder de asimilación de la planta aumenta a medida que sus órganos se desarrollan. La tercera es una fase de estabilización, donde después del inicio de la fructificación ocurre una disminución del crecimiento hasta estabilizarse. Debido a la etapa en la que se midió el crecimiento, la planta aún es joven y cuenta con un área foliar y un sistema radical reducido, lo cual se evidencia en los controles inoculados solo con los patógenos (Figura 14) en donde las plántulas no alcanzaron ni los 10 cm de altura comparadas con los tratamientos con hongos patógenos + bacteria con o sin micorriza, en donde la altura mínima a los 49 días

fue de 10.55 cm para Bs B23 + M+ FP y la máxima de 20.26 cm para Bs B23 + M + R quizá esto se deba a que el patógeno FP fue más virulento que R; sin embargo, en todos tratamientos la tendencia es al incremento en altura, que en la mayoría de los casos muestra un tipo como el descrito por Rylski (1986) para la primera fase; aunque en algunas combinaciones donde se incluye a B23 se puede notar un tipo de crecimiento que en el mismo caso correspondería a la segunda fase, según el mismo autor.

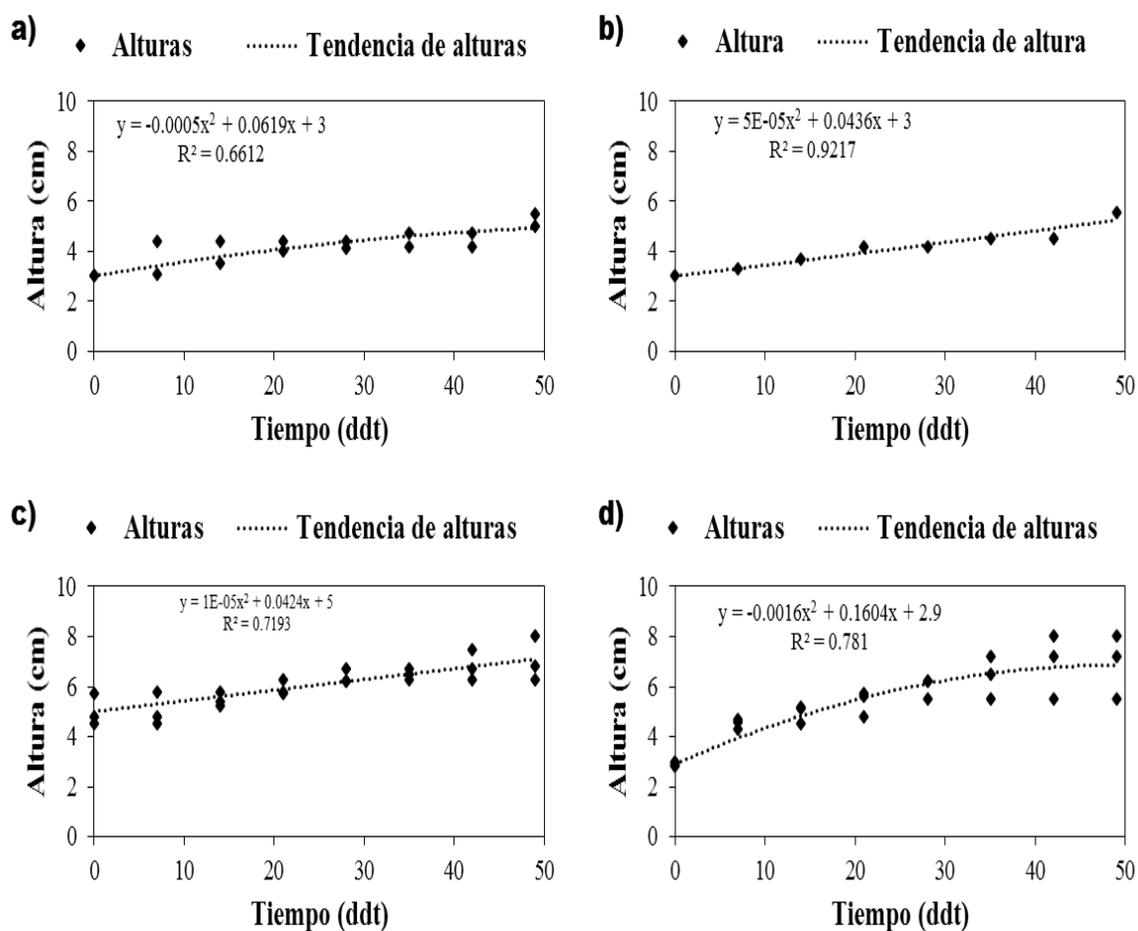


Figura 14. Altura de plántulas de chile tipo 'guajillo' en plantas control (inoculadas solo con hongos patógenos): a) FP; b) FN; c) FA y d) R. La línea representa la tendencia del modelo y los puntos indican los datos reales.

5.4.2. Producción de materia seca (g)

Al evaluar el efecto de la inoculación de *Pseudomonas chlororaphis* B8 y *Pseudomonas* sp. B14 sobre la producción de materia seca en plántulas de chile inoculadas con hongos patógenos causantes del damping off (la inoculación del patógeno se realizó 4 días posteriores a la inoculación bacteriana), el mayor peso seco se registró en plántulas inoculadas con *Pseudomonas* sp. B14 infectadas con *Fusarium* sp. (FN, FA) y *Rhizoctonia* sp. (R) respectivamente, igualmente cuando se combinaron ambas cepas bacterianas para el caso de las plántulas infectadas con FP (Figura 15). Mientras que con la cepa *Pseudomonas chlororaphis* B8 los mayores pesos (0.28 y 0.27 g) se obtuvieron en plántulas infectadas con FA y R; sin embargo, el mayor incremento en la producción de materia seca se obtuvo en plántulas infectadas por FA (115%) y FN (43%), con respecto a sus respectivos controles. Tales incrementos son superiores a los reportados por Luna *et al.* (2013), quienes estudiaron el efecto de cuatro cepas pertenecientes al género *Bacillus* sobre el crecimiento de las plántulas de pimiento, quienes reportan un incremento en biomasa de 37 y 16% al inocular las cepas MA y MA17, respectivamente.

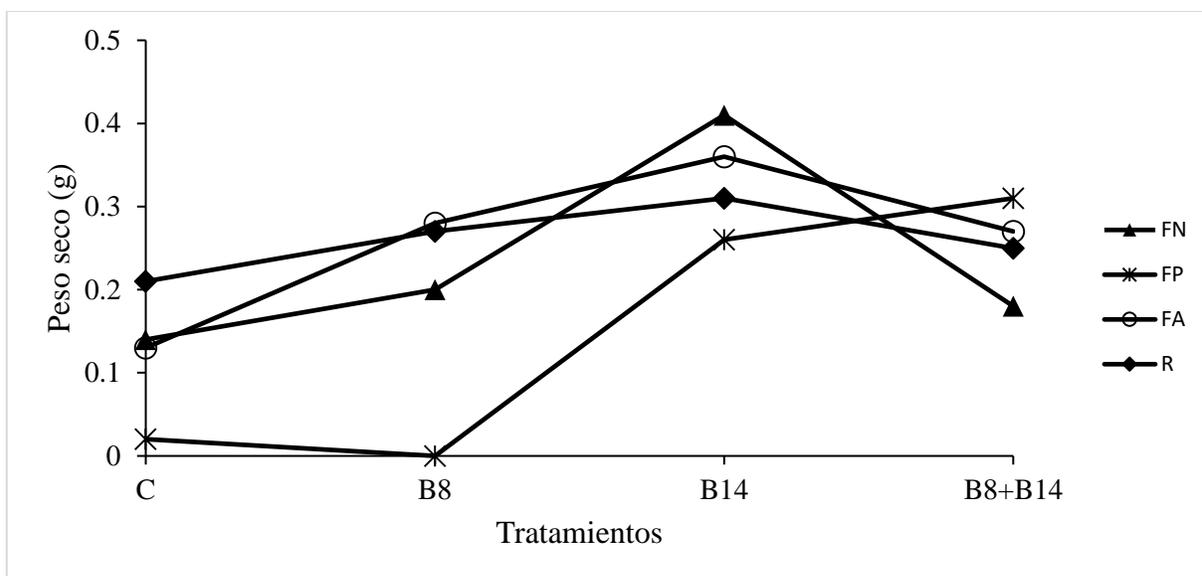


Figura 15. Efecto de la inoculación de dos cepas de *Pseudomonas* sobre la producción de materia seca en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C= plantas control inoculadas solo con el patógeno; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; B8+B14=inoculación combinada.

Cabe señalar que la inoculación de la cepa B8 en plántulas infectadas por *Fusarium* púrpura (FP) no tuvo ningún efecto, debido a que las plántulas no sobrevivieron. Al respecto, Agaras *et al.* (2015), al estudiar 19 aislamientos de *Pseudomonas* para el biocontrol de 12 hongos fitopatógenos de diferentes cultivos mencionan que los diferentes aislamientos bacterianos no presentan el mismo nivel de inhibición en cada hongo estudiado. Por otra parte, se ha reportado al complejo de *Pseudomonas chlororaphis* como promotor del crecimiento de diferentes cultivos (Rosas *et al.*, 2007) y su potencial como agente de control biológico se ha asociado a su producción de fenazina-1-carboxamida, el cual es un metabolito antifúngico (Chin-A-Woeng *et al.*, 2001). El control de la enfermedad por agentes de control biológico es a través de diferentes modos de acción, los cuales incluyen, competencia, parasitismo directo, antibiosis e inducción de mecanismos de resistencia de las plantas (Whipps, 2001). Ninguno de estos

mecanismos, necesariamente son mutuamente excluyentes y frecuentemente varios modos de acción son ejercidos por un solo agente de control biológico.

En la Figura 15, se puede observar que al inocular ambas cepas bacterianas el mayor peso seco se registró en plántulas infectadas por FP. Cabe señalar que la producción de materia seca de las plántulas inoculadas por ambas cepas bacterianas en todos los casos fue mayor al obtenido en plántulas control, al obtener un incremento de peso seco del 29; 1,450; 108 y 19% en las plántulas infectadas por FN, FP, FA y R, respectivamente. Al respecto, Khabbaz y Abbasi (2014), al estudiar el efecto de la inoculación por separado o en combinación de las cepas *Pseudomonas fluorescens* (9A-14), *Pseudomonas* sp. (8D-45) y *Bacillus subtilis* (8B-1), suprimieron el damping off en plántulas de pepino, a través de un incremento en la producción de materia fresca en promedio de 92 a 245% sobre controles infestados. El control de la enfermedad y promoción del crecimiento por efecto de la inoculación combinada de las cepas puede ser debido a diferentes mecanismos utilizados por estas cepas y también podrían ser debido a efectos aditivos o sinérgicos (Khabbaz y Abbasi, 2014). Sin embargo, las interacciones antagónicas entre agentes de biocontrol es más probable que ocurran que las interacciones sinérgicas (Xu *et al.*, 2011); lo cual puede explicar la respuesta observada en el presente estudio, para el caso de la inoculación de ambas cepas en plantas infectadas por R, FA y FN.

Por otra parte, al coinocular *Bacillus* sp. B23 y el consorcio *Glomus* spp. Zac-19 se obtuvo la mayor producción de materia seca de la parte aérea de plántulas de chile infectadas con los hongos *Fusarium* sp. FA y *Rhizoctonia* sp. R (Figura 16); mientras que con la inoculación de *Pseudomonas chlororaphis* B8 y el consorcio de *Glomus* spp. Zac-19 se incrementó la producción de materia seca en plántulas infectadas por *Fusarium* púrpura con respecto a la inoculación por separado con la cepa B8 (las plántulas no sobrevivieron, Figura 15) o el

consorcio de *Glomus* spp. Zac-19 (Figura 16), por lo que se asume que *Glomus* spp. Zac-19 tuvo un efecto sinérgico con *Pseudomonas chlororaphis* B8 y *Bacillus* sp. B23.

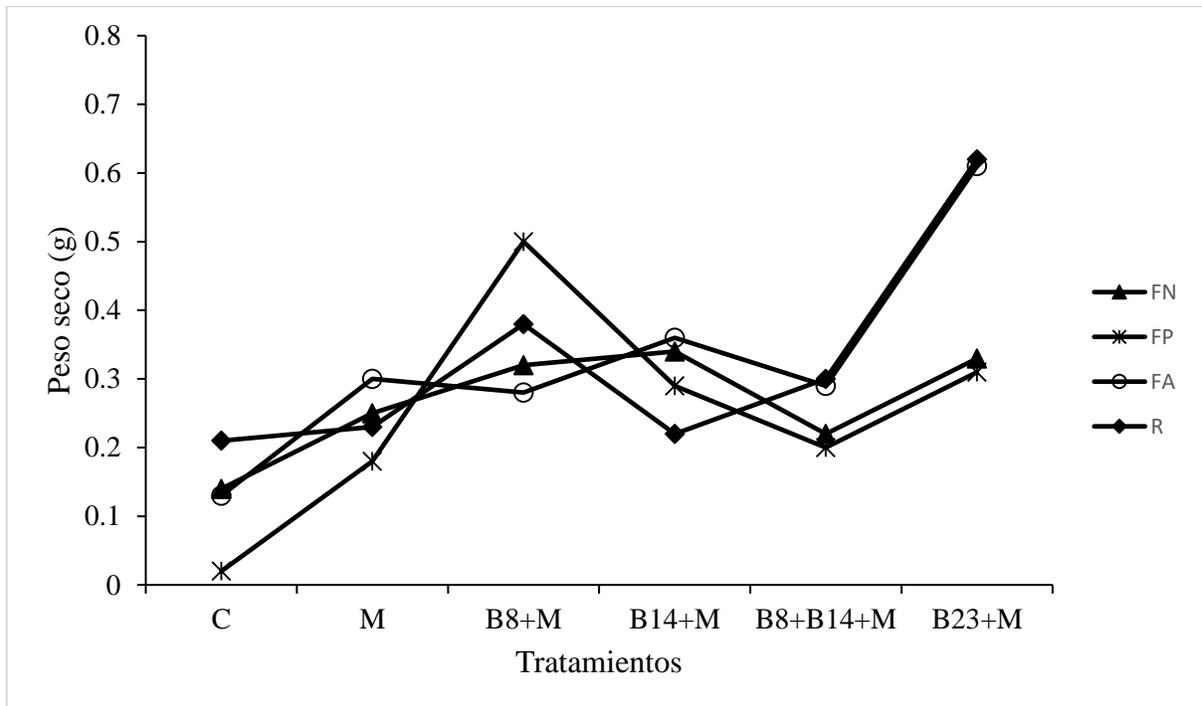


Figura 16. Efecto de la coinoculación rizobacteria/hongo micorrízico sobre la producción de materia seca en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C=control plantas inoculadas solo con el patógeno; M= consorcio *Glomus* spp. Zac-19; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; B8+B14+M=inoculación combinada; B23= *Bacillus* sp.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Chamizo *et al.* (2009), quienes mencionan que la inoculación combinada del consorcio *Glomus* spp. Zac-19 y las bacterias *P. aeruginosa* 11PS, *B. cepacia* P13 y tres cepas de *Hafnia alvei* (P25, S1AS y P27) incrementaron significativamente el peso seco de la parte aérea con respecto a los tratamientos testigo sin bacteria y con aquellos tratamientos en los se inocularon las bacterias por separado, excepto con *P. aeruginosa* 11PS, observándose un sinergismo significativo entre el consorcio y las bacterias mencionadas.

Por su parte, Aguirre-Medina y Espinosa (2016) reportan una mayor acumulación de biomasa seca de la lámina foliar en plantas de chile inoculadas con *A. brasilense*, *P. fluorescens* y la combinación *R. intraradices* + *A. brasilense* a los 28 ddt, *R. intraradices* y *A. brasilense* inoculadas por separado a los 56 ddt, y al final de la evaluación a los 84 ddt, todos los tratamientos superaron al tratamiento inoculado con los tres microorganismos. Sin embargo, es importante destacar que en estos estudios las plantas de chile no fueron infectadas con hongos patógenos.

La figura 17 ejemplifica la respuesta de plántulas de chile tipo 'guajillo' a la inoculación de rizobacterias y micorrizas en este trabajo.



Figura 17. Comparación de plántulas de chile infectadas por *Fusarium* sp. (FN, FA, FP) y *Rhizoctonia* sp. (R) e inoculadas con *Pseudomonas chlororaphis* B8; *Pseudomonas* sp. B14; *Bacillus* sp. B23; *Glomus* spp. Zac-19 y plantas control.

5.4.3. Porcentaje de Fósforo y Nitrógeno foliar

El mayor porcentaje de fósforo (P) foliar (0.51 y 0.40%), se obtuvo en plántulas infectadas por *Fusarium* sp. FN e inoculadas con *Pseudomonas* sp. B14 e inoculación de ambas cepas bacterianas (*Pseudomonas chlororaphis* B8 y *Pseudomonas* sp. B14), respectivamente (Figura 18), siendo estadísticamente diferente al reportado en las plántulas inoculadas solo con *Pseudomonas chlororaphis* B8, y al de plántulas donde se realizó la inoculación del consorcio *Glomus* spp. Zac-19 o al combinar este con las cepas bacterianas. Es importante señalar que la inoculación sola o la coinoculación de rizobacterias y micorrizas incrementó significativamente el porcentaje de P foliar en todos los casos, con respecto a las plántulas control. Al respecto, Martínez-Rojas (2015) reporta un porcentaje de P foliar similar al encontrado en el presente estudio en plantas sanas de *Capsicum annuum* variedad California wonder y 0.43% de P foliar en plántulas inoculadas con *Glomus manihotis*, *Acaulospora lacunosa* + *Glomus manihotis* y de 0.603% en plantas inoculadas con *A. lacunosa*, siendo estadísticamente igual el porcentaje de P foliar en plantas testigo y plantas inoculadas con *A. lacunosa*.

Por otra parte, si bien no existe diferencia estadística significativa en la concentración de P entre plántulas infectadas por FP, FA y R con respecto a la inoculación de las cepas bacterianas y hongos micorrízicos, si se observa una mayor concentración de P foliar cuando las plántulas fueron inoculadas por separado o al combinar las cepas bacterianas con respecto a cuando se inocularon las plántulas con el consorcio *Glomus* spp. Zac-19 (Figura 18). Es importante mencionar que en las plántulas control infectadas con FP no fue posible analizar P foliar (debido a que se contaba con poca muestra de tejido vegetal y solo se analizó el porcentaje de N); las plántulas infectadas por este mismo hongo e inoculadas con B8 murieron. Valdez *et al.* (2005)

proponen 0.31% como rango óptimo para la concentración de P en tejido vegetal de *Capsicum annuum* cv. Mirasol y *C. annuum* tipo 'guajillo'. De acuerdo a este valor, todas las plántulas inoculadas con las cepas *Pseudomonas chlororaphis* B8 y *Pseudomonas* sp. B14 solas o combinadas se encuentran en el rango óptimo de concentración de P.

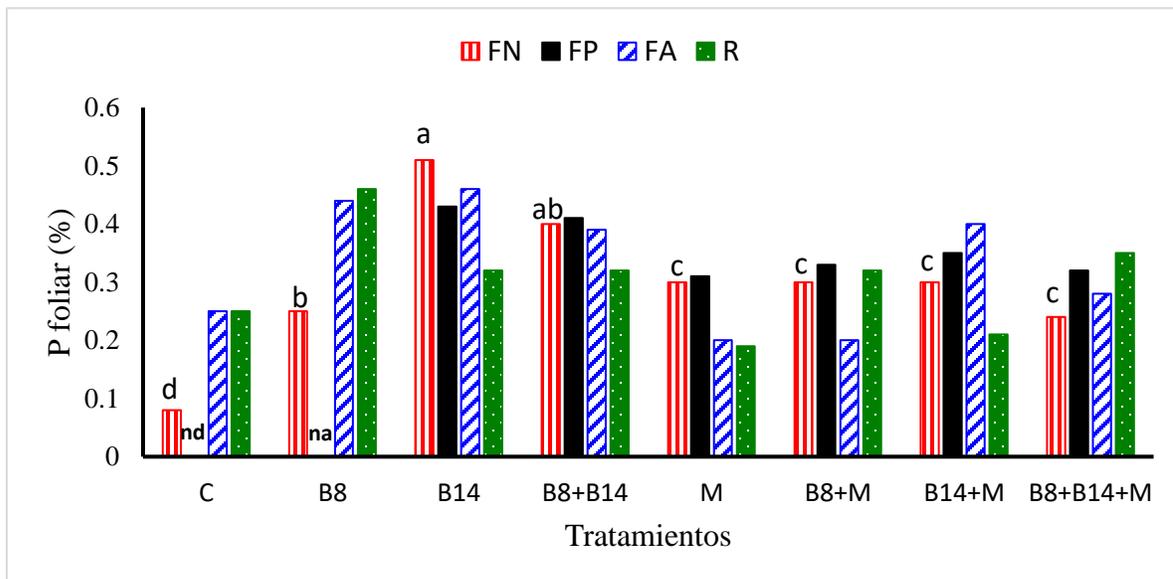


Figura 18. Efecto de la inoculación de rizobacterias y micorrizas sobre el porcentaje de P foliar en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C= Plantas control inoculadas solo con el patógeno; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; M=consorcio *Glomus* spp. Zac-19. (na=no analizado). Columnas con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey 0.05).

Los resultados del efecto de la inoculación de las cepas de *Pseudomonas* pueden ser explicados debido a que este género presenta propiedades clave como un agente de control biológico eficaz; es decir, competencia en la rizósfera, promoción del crecimiento de las plantas y actividad antifúngica (Nautlyal *et al.*, 2002).

Con respecto al porcentaje de nitrógeno foliar (N foliar), no se encontró diferencia significativa en plántulas infectadas por *Fusarium* sp. FP y FA. Pero si existe diferencia significativa en las

plántulas infectadas por *Fusarium* sp. FN al inocular el consorcio *Glomus* spp. Zac-19 o la coinoculación de Zac-19+ambas cepas de rizobacterias (Figura 19) con respecto al resto de los tratamientos evaluados, mientras que en plántulas infectadas por *Rhizoctonia* sp. (R) el mayor porcentaje se encontró en plántulas inoculadas con ambas cepas bacterianas con respecto a la inoculación de *Pseudomonas* sp. B14.

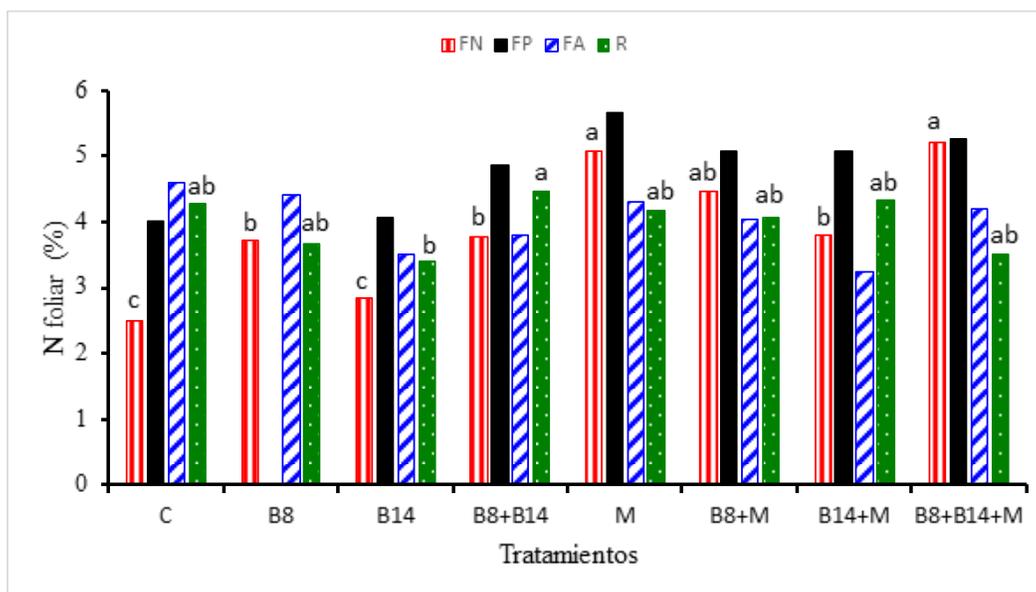


Figura 19. Efecto de la inoculación de rizobacterias y micorrizas sobre el porcentaje de N foliar en plántulas de chile infectadas por hongos patógenos. C= Plantas control inoculadas solo con el patógeno; B8= *Pseudomonas chlororaphis*; B14= *Pseudomonas* sp.; M=consorcio *Glomus* spp. Zac-19.

El incremento en la concentración de N foliar por efecto del consorcio Zac-19 y de la inoculación por separado de las bacterias concuerda con lo reportado por Chamizo *et al.* (2009), quienes mencionan que la inoculación del consorcio micorrízico Zac-19 en general incrementó las concentraciones de N y P hasta dos veces más que en las plantas inoculadas con las bacterias por separado.

El incremento de N y P foliar en los tratamientos con micorriza puede ser debido a que los HMA incrementan la captación de agua y nutrimentos como P, N, K y Ca. Díaz *et al.* (2013) también reportan que las concentraciones de N y P foliar fueron significativamente superiores en plantas de *Capsicum annuum* inoculadas con hongos formadores de micorrizas.

Se ha demostrado que los microorganismos promotores del crecimiento, incluyendo las PGPR y hongos micorrízicos arbusculares, tienen un efecto directo o primario en la nutrición vegetal (Cano, 2011). Este mismo autor menciona, que estudios recientes muestran la potencialidad del uso de estos inoculantes, como agentes de control biológico, considerándolo como un efecto secundario de esta interacción.

5.4.4. Porcentaje de colonización micorrízica total y número total de esporas

Los mayores porcentajes de colonización micorrízica total (CMT) correspondió a la inoculación por separado del consorcio *Glomus* spp. Zac-19 en plántulas infectadas por *Fusarium* sp. FA y *Rhizotocnia* sp. R, con 97.9 y 89.4%, respectivamente (Cuadro 6), lo cual fue estadísticamente diferente a la CMT de plántulas coinoculadas con *Bacillus* sp. B23 y el consorcio *Glomus* spp. Zac-19 en plántulas infectadas con *Fusarium* sp. FN y *Rizoctonia* sp. R (44.07 y 39.63%, respectivamente). Al respecto, Jaizme-Vega *et al.* (2006) reportan valores más bajos entre el 15% y 31% de colonización micorrízica en plantas de papaya infectadas por el nemátodo *Meloidogyne incognita* e inoculadas con dos hongos micorrízicos y un consorcio de *Bacillus* spp., donde el mayor porcentaje de colonización micorrízica se encontró al realizar la coinoculación de *Glomus mosae* y un consorcio de *Bacillus* spp., con respecto a la inoculación de *G. mosae* en plantas infectadas por el nematodo. Por su parte, Mridha y Dhar (2007) reportan un porcentaje de CMT de 79% en plantas de *Capsicum frutescens*. Por el contrario, Schroeder

y Janos (2005) reportan porcentajes más bajos (1.5 a 20.4%) en *C. annuum*. Con respecto al consorcio *Glomus* spp. Zac-19, Davies *et al.* (2002) encontraron un porcentaje de 51.9 de colonización micorrízica total en plántulas de chile ancho (*C. annuum* L. cv. San Luis), este porcentaje fue ligeramente menor al encontrado en este estudio, cuando solo se inoculó Zac-19.

Con respecto al número de esporas los valores más altos se encontraron en los tratamientos (B14+Zac-19) y (Zac-19) en la rizosfera de plántulas infectadas con *Rhizoctonia* sp. R, (700 y 658 esporas/100 g suelo, respectivamente), siendo estadísticamente diferente a los valores reportados en los tratamientos B14+Zac-19 donde se inoculó FN y FA (Cuadro 6). Estos resultados son superiores a los reportados por Mridha y Dhar (2007), quienes obtuvieron una población total de esporas de 129 esporas en 100 g de suelo seco en *Capsicum frutescens*, debido probablemente a las condiciones de humedad en la que se mantuvo el experimento. Así como por lo reportado por Montero *et al.* (2010), que obtuvo 48.33 y 50.2 esporas de *Glomus hoi-like* y *Glomus mosseae*, respectivamente, en 50 g de suelo en sustrato con riego al 90% de capacidad de campo (cc) en plántulas de *Capsicum annuum* L. Estos valores bajan cuando el riego es de 65% cc, hasta un número de 43.6 y 45.08 esporas 50 g de suelo de *Glomus hoi-like* y *Glomus mosseae*, respectivamente, lo cual se debió a la humedad presente en el suelo.

Rodríguez *et al.* (2010) encontraron mayor cantidad de esporas a las reportadas por los autores anteriores; estas fueron 51 esporas por gramo de suelo en plantas de *Capsicum* spp., en almácigo con fertilización de síntesis química completa más abono orgánico y micorrizas. Castillo *et al.* (2009) reportan también una cantidad más baja de esporas en plantas de *Capsicum annuum* L. entre los 170 y 205 días después de la siembra con 393 esporas 100 mL⁻¹. Cabe mencionar que en todos estos estudios las plántulas no fueron infectadas por hongos patógenos.

Cuadro 6. Porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas por 100 g suelo en los tratamientos con hongo micorrízico arbuscular en ausencia o presencia del patógeno en la planta.

Patógenos	Tratamientos							
	B8+ZAC-19		B14+ZAC-19		B23+ZAC-19		ZAC-19	
	CMT (%)	Esporas (100g suelo)	CMT (%)	Esporas (100g suelo)	CMT (%)	Esporas (100g suelo)	CMT (%)	Esporas (100g suelo)
FP	60.00ab	433bcd	74.26ab	342bcd	80.56ab	675abc	79.07ab	592abcd
FN	67.50ab	750ab	70.09ab	287cd	44.07b	475bcd	75.55ab	417bcd
FA	63.45ab	458bcd	59.58ab	213cd	51.30ab	475bcd	89.44ab	325bcd
R	73.33ab	917a	67.04ab	700abc	39.63b	542abcd	97.96a	658abc

6. CONCLUSIONES

- La caracterización *in vitro* de 18 aislamientos bacterianos provenientes de la rizosfera de maíz permitió identificar cuatro cepas (B23, B7, B9 y B15) con potencial antagónico sobre *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. causantes del damping off; siendo la cepa B23 la más eficiente al inhibir el crecimiento micelial de los cuatro hongos evaluados, *Rhizoctonia* sp. (56%), *F. púrpura* (50%), *F. amarillo* (47%) y *F. naranja* (44%).
- Dos cepas, presentaran potencial como promotoras del crecimiento; debido a su capacidad para producir ácido indolacético (AIA) y solubilizar fosfato tricálcico insoluble [Ca₃(PO₄)₂]: B14 presenta la capacidad de producir 11.2 µg mL⁻¹ de AIA cantidad suficiente para estimular el crecimiento del cultivo de chile; mientras que B8, presenta la capacidad para solubilizar fosfato insoluble, lo cual incrementa la cantidad de fósforo en la rizósfera, que puede ser aprovechado para un mejor crecimiento y desarrollo del cultivo.
- La identificación molecular de las cepas y hongos fitopatógenos antes mencionados nos permitió identificar a: B8 y B9 como *Pseudomonas chlororaphis*; B7 y B14 como *Pseudomonas* sp. B15 como *Pseudomonas protegens* y B23 como *Bacillus* sp. En cuanto a los hongos, FP y FN corresponden a *Fusarium* sp. y FA a un hongo no cultivado.
- Bajo condiciones *in vivo*, 34 días después de la inoculación de *Pseudomonas* sp. B7 la supervivencia de plántulas de chile infectadas por *Fusarium purpura* fue del 71.4% y la de las plántulas control fue del 30%; mientras que a los 55 días, se obtuvo una mayor supervivencia de las plántulas inoculadas con B7 e infectadas por: *Fusarium amarillo*; *F. naranja* y *Rhizoctonia* sp. de 80, 100 y 83.3% respectivamente, en relación a la supervivencia de sus respectivos controles (44.4; 37.5 y 41.7%).

- Los resultados del estudio *in vitro* y de supervivencia de plántulas de Chile infectadas por *Fusarium* sp. o *Rhizoctonia* sp., muestran que el damping off puede ser efectivamente manejado a través de la inoculación de rizobacterias las cuales ejercen mecanismos directos, tales como producción de AIA y solubilización de fosfato insoluble; o bien a través de un mecanismo indirecto, como el antagonismo.
- La inoculación por separado de B14 fue la que tuvo mayor efecto sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas; cuando esta cepa se combinó con B8, o se coinoculó con la cepa micorrízica Zac-19 se registró una disminución en las variables de crecimiento.
- El efecto de sinergia entre rizobacterias y hongos micorrízicos, solo se observó cuando se inoculó: *Pseudomonas chlororaphis* B8 más *Glomus* spp. Zac19 en plántulas infectadas por *Fusarium* purpura; *Bacillus* sp. B23 más *Glomus* sp. Zac19 en plántulas infectadas por *Rhizoctonia* sp. o por *Fusarium* amarillo.
- En general, la inoculación sola, combinada o coinoculación de: B23, B14, B8 y *Glomus* spp. Zac-19 suprimieron el damping off en plántulas de Chile, lo cual se reflejó en un mayor crecimiento del cultivo.
- Los resultados de este estudio sugieren que la enfermedad damping off en plántulas de Chile tipo 'guajillo' cuyos agentes causales sean *Fusarium* o *Rhizoctonia* puede ser manejada a través del uso de biorecursos tal es el caso de las PGPR y hongos micorrízicos, cuya eficiencia puede ser mejorada mediante re-inoculación a los 30 días después de la primera aplicación. Lo cual puede representar una alternativa biotecnológica en el manejo de la enfermedad.

7. LITERATURA CITADA

- Abo E. H. I.G. y Ahmed N. G. (2007). Pathogenicity, toxicity and gibberellic acid content of *Fusarium moniliforme* causing root rot and damping off of pepper. *Plant pathology journal* 6(4): 318-323.
- Abdel-Monaim M. F. (2013). Improvement of Biocontrol of Damping-off and Root Rot/Wilt of Faba Bean by Salicylic Acid and Hydrogen Peroxide. *Mycobiology*. 41(1):47-55. English.
- Agarwal P. y Sah P. (2009). Ecological Importance of Ectomycorrhizae in World Forest Ecosystems. *Nature and Science* 7(2): 107-116.
- Agaras B. C., Scandiani M., Luque A., Fernández L., Farina F., Carmona M., Gally M., Romero A., Wall L. y Valverde C. (2015). Quantification of the potential biocontrol and direct plant growth promotion abilities based on multiple biological traits distinguish different groups of *Pseudomonas* spp. Isolates. *Biological Control* 90: 173–186.
- Aguirre-Medina J.F. y Espinosa M. J.A. (2016). Crecimiento y rendimiento de *Capsicum annuum* L. inoculado con endomicorriza y rizobacterias. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(7): 1539-1550.
- Agrios G. (1998). *Fitopatología*. 3a. Ed. México. Limusa
- Agrios NA (1988) *Plant pathology*, 3rd edn. Academic Press, U S A pp 220–222.
- Ahmad, F.; Ahmad, I. and Khan, M. S. 2005. “Indole acetic acid production by the indigenous isolated of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan”. *Turk. J. Biol.*, 29: 29-34.
- Ahmed D., Shahab S. y Safiuddin (2013). Pathogenic potential of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and root-rot fungus *Fusarium solani* on chilli (*Capsicum annuum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46 (18): 2182–2190.
- Ait Toyeb L., Ageron E., Grimont F. y Grimont P.A. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. *Res Microbiology*. 156(5-6): 763-773.
- Akhtar M. S. y Siddiqui Z. A. (2009). Effects of phosphate solubilizing microorganisms and *Rhizobium* sp. on the growth, nodulation, yield and root-rot disease complex of chickpea under field condition. *Afr J Biotechnol* 8: 3489–3496.
- Akiyama K. y Hayashi H. (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbiosis and parasitic weeds in plant roots. *Ann Bot* 97: 925–931.

- Akköprü A. y Demir S. (2005). Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *J Phytopath* 153: 544-550.
- Anaya L., González C., Villordo P. E., Rodríguez G. R., Rodríguez M. R., Guevara G. R. G., Guevara O., Montero T. V. y Torres P. (2011). Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2(3): 373-383.
- Andrade-Torres A. (2010). MICORRIZAS: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia* pp. 80-90.
- Antoun H. y Kloepper J. W. (2001). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). pp. 1477-1480. In: S. Brenner and J. H. Miller (eds.). *Encyclopedia of genetics*. Academic Press. New York, NY, USA.
- Artursson V., Finlay R. D., Jansson J. K. (2006). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, 8(1): 1-10.
- Azcón A. C. y Barea J. M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil borne pathogens—an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6:457–464.
- Azofeifa A. y Moreira M. A. (2004). Análisis de crecimiento del chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. cv. Hot), en Alajuela, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(1): 57-67.
- Badri D., Weir T., van der Lelie D., Vivanco J. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642–650.
- Balota E. L., Colozzi-Filho A., Andrade D. S. y Hungria M. (1998). Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessã ode culturas. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 22: 641–649.
- Banerjee S., Palit R., Sengupta C. y Standing D. (2010). Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Sciences*. 4(6):378-383.
- Bashan Y. y Holguin G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growthpromoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem* 30:1225–1228
- Beattie G. 2006. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: *Plant-Associated Bacteria*, pp: 1– 56. S.S. Gnanamanickam (ed). Springer, The Netherlands.

- Beneduzi A., Ambrosini A. y Passaglia L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 1044-1051.
- Berg G. y Smalla K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68(1): 1–13.
- Bharardwaj D. P., Alström S. y Lundquist P.-O. (2012). Interactions among *Glomus irregular*, arbuscular mycorrhizal spore-associated bacteria, and plant pathogens under in vitro conditions. *Mycorrhiza* 22:437–447.
- Blaya J., Lloret E., Ros M. y Pascual J.A. (2014). Identification of predictor parameters to determine agro-industrial compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* diseases in muskmelon and pepper seedlings. *J Sci Food Agric*; 95:1482–1490.
- Brewer M. T. y Larkin R. P. (2005). Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Prot* 24:939–950.
- Bric J. M., Bostock R. M., Silverstone S. E. (1991). Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. *Applied and environmental microbiology*, 57(2): 535-538 DOI0099-2240/91/020535-04\$02.00/0.
- Cavaletti L., Monciardini P., Bamonte R., Schumann P., Rohde M., Sosio M. y Donadio S. (2006). New Lineage of Filamentous, Spore-Forming, Gram-Positive Bacteria from Soil. *Appl. Environ. Microbiol* 72(6): 4360-4369. doi: 10.1128/AEM.00132-06.
- Caro E. M., Leyva M. C. y Ríos S. J. (2014). Competitividad mundial de la producción de chile verde de México. *Revista de Economía XXXI* (83): 95-128.
- Cano M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. UDCA Act. & Div. Cient.* 14(2): 15-31.
- Castillo C. G., Ortiz C. A., Borie F. R. y Rubio R. E. (2009). Respuesta de Ají (*Capsicum annuum* L.) cv. “Cacho de Cabra” a la Inoculación con Hongos Micorrízicos Arbusculares. Response of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) cv. “Cacho de Cabra” to the Inoculation with Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Información Tecnológica* 20(4): 3-14.
- Chamizo A., Ferrera C. R., González C. M. C., Ortiz S. C. A., Santizo R. J. A., Varela L. y Alarcón A. (2009). Inoculación de alfalfa con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo. *Terra Latinoamericana* 27: 197-205.
- Chew M.Y.I., Vega P. A., Palomo R. M. y Jiménez D. F. (2008). Principales enfermedades del Chile (*Capsicum annuum* L.). Folleto técnico num.15. Secretaria de Agricultura,

Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigadores Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro Campo Experimental la Laguna. México, Coahuila. 32 p.

- Chin-A-Woeng T. F., van den Broek D., de Voer G., van der Drift K. M., Tuinman S., Thomas-Oates J. E., Lugtenberg B. J. y Bloemberg G. V. (2001). Phenazine-1- carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. *MPMI* 14: 969–979.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C. y Barka E. A. (2005). Use of plant growth - promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 4951–4959.
- Copley T. R., Aliferis K. A. y Jabaji S. (2015). Maple bark biochar affects *Rhizoctonia solani* metabolism and increases damping-off severity. *Phytopathology, Disease control and pest management* 105 (10): 1334-1346.
- Coskuntuna A. y Özer N. (2008). Biological control of onion basal rot disease using *Trichoderma harzianum* and induction of antifungal compounds in onion set following seed treatment. *Crop Prot* 27: 330-336.
- CuiLin Y., Kaul H. P., Kübler E., Schwadorf K., Aufhammer W. (2001). Head blight (*Fusarium graminearum*) and deoxynivalenol concentration in winter wheat as affected by pre-crop, soil tillage and nitrogen fertilization. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108(3): 217-230.
- Das S. N., Saha P., Gurung B. y Bhowmick A. (2015). Application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for enhanced crop growth. Consultado en <http://www.krishisewa.com/articles/soil-fertility/636-pgpr-crop-growth.html> en 2016.
- Dames J. F. (2014). Chapter 3 Biological Control: PGPR and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Working Together. In: M. Miransari (ed.), *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses*, DOI: 10.1007/978-1-4939-0721-2_3, Springer Science+Business Media New York 2014.
- Davies Jr. F. T., Olalde P. V., Aguilera G. L., Alvarado M. J., Ferrera C. R. C., Boutton T. W. (2002). Alleviation of drought stress of Chile ancho pepper *Capsicum annuum* L. cv. San Luis) with arbuscular mycorrhiza indigenous to Mexico. *Scientia Horticulturae* 92: 347-359.
- Devau N., Cadre E. L., Hinsinger P., Jaillard B. y Gérard F. (2009). Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modelling approaches. *Applied Geochemistry* 24 (11): 2163–2174.
- Devika-Rani G. S., Nalk M. K., Patil M. G. y Mohan-Kumar H. D. (2007). Abstracts of papers presented during the 59 Annual Meeting and National Symposium on “Plant pathogens:

- Exploitation and management” at department of biological sciences, R. D. university Jabarpur (MP) during January 16-18, 2007. *Indian Phytopathology* 60 (3): 386-417.
- Di Rienzo J. A., Casanoves R. F. M. G., Balzarini B., Gonzalez M. L., Tablada T. M. y Robledo C.W. (2014). S. InfoStat versión. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Díaz F. A., Alvarado C. M., Ortiz Ch. F. y Grageda C. O. (2013). Nutrición de la planta y calidad de fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. Plant nutrition and fruit quality of pepper associated with arbuscular mycorrhizal in greenhouse. *Notas de investigación. Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 4 (2).
- Díaz P. L. N. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2): 32-55.
- Djordjevic M., Ugrinovic M., Sevic M., Djordjevic R. y Mijatovic M. (2011). Antagonistic effect of soil bacteria against fusarium wilt of pepper in vitro. *Acta Agriculturae Serbica*. XVI: 19-31.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J. y Okon Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22:147– 149.
- Duan X., Bi H. G., Li T., Wu G. X., Li Q. M. y Ai X. Z. (2016). Root characteristics of grafted peppers and their resistance to *Fusarium solani*. *Biologia Plantarum* XX (X): XXX-XXX, 20XX.
- Dwivedi D., Johri B. N., Ineichen K., Wray V., Wiemken A. (2009). Impact of antifungals producing rhizobacteria on the performance of *Vigna radiate* in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 19:559–570.
- Figuerola-López A. M., Cordero R. J. D., Martínez A. J. C., López M. M., Lizárraga S. G. J., Félix G. R., Castro M. C., Maldonado M. I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. Springer Plus. DOI: 10.1186/s40064-016-1780-x.
- Fitter A. H., Helgason T. Y Hodge A. (2011). Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Implications for sustainable agriculture. *funga l b i o l o g y r e v i e w s* 25: 68-72.
- Fox G.E., Wisotzkey J.D. y Jurtshuk P. Jr. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematics Bacteriology*. 42 (1): 166-170.
- Gerdemann J. W. y Nicolson T. H. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transaction of British Mycological Society*, 46: 235–244.

- Gianinazzi-Pearson V., Dumas-Gaudot E., Gollotte A., Tahiri-Alaoui A. y Gianinazzi S. (1996). Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 133 : 45-57.
- Glick B. R. (2015). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. ISBN 978-3-319-13920-3 ISBN 978-3-319-13921-0 (eBook) DOI 10.1007/978-3-319-13921-0. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. Springer International Publishing Switzerland.
- Goldberg N.P. (1995). *Chile Pepper Diseases*. Agricultural Experiment Station. College of Agriculture and Home Economics. New Mexico State University. Circular 549. Las Cruces, NM, USA. 20 p.
- González-Chavira M.M., Torres-Pacheco I. y Guzmán M. H. (2002). Patógenos involucrados en la marchitez del chile. Proceedings of the 16th International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas. México.
- González P. E., Yáñez M. M.M.J., Santiago S.V., Montero P.A. (2004). Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. *Agrociencia* 38:653-661.
- Goswami D., Dhandhukia P., Patel P. y Thakker J. N. (2014). Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research* 169: 66– 75.
- Goswami D., Thakker J. N. y Dhandhukia P. C. (2015). Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods* 110 (2015) 7–14.
- Gray E.J. y Smith D.L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37:5–412.
- Gross H. y Loper J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite productions by *Pseudomonas* spp. *Natural Proceedings Reports*. 26 (11):1408-46.
- Guigón L. C. y González G. P. A. (2001). Estudio regional de la enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19:49-56.
- Guigón L. C. y González G. P. A. (2003). Selección de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. con Actividad Antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y Promotoras de Crecimiento en el Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(001): 117-124.
- Guillén-Cruz R., Hernández-Castillo F. D., Gallegos-Morales G., Rodríguez-Herrera R., Aguilar-González C. N., Padrón-Corral E., Reyes-Valdés M. H. (2006). *Bacillus* spp.

- como Biocontrol en un Suelo Infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su Efecto en el Desarrollo y Rendimiento del Cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) Revista Mexicana de Fitopatología 24 (2) 105-114.
- Haas D. y Defago G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat Rev Microbiol 3:307–319.
- Hameed A., Wu Q.S., Abd-Allah E. F., Hashem A., Kumar A., Lone H. A. y Ahmad P. (2014). Chapter 4 Role of AM Fungi in Alleviating Drought Stress in Plants in: M. Miransari (ed.), Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses.
- Harris J., New P. y Martin P. (2005). Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. Soil Biol. Biochem. 38: 1521–1526.
- Hassan D. Gh., Hassan M. G., Rashid H., Ali D. W. y Majeed M. (2015). Evaluation of Microbial Antagonists for the Management of Wilt/ Root Rot and Damping-off Diseases in Chilli (*Capsicum annuum*). Rev. Vegetos. Vol. 28 (4): 102-110.
- He H., Qian T.-T., Liu W.-J., Jiang H. y Yu H.-Q. (2014). Biological and chemical phosphorus solubilization from pyrolytical biochar in aqueous solution. Chemosphere 113 (2014) 175–181.
- Herrera T. y Ulloa M. (1998). El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2da. Ed. México: FCE, IB, UNAM 1998 552 p. Segunda reimpresión 2013.
- Hernández W. y Salas E. (2009). La inoculación con *Glomus fasciculatum* en el crecimiento de cuatro especies forestales en vivero y campo. Agronomía Costarricense 33(1): 17-30. ISSN:0377-9424 / 2009.
- Hewitt E. J. (1966). The composition of the nutrient solution. pp. 187-246. In: Hewitt E. J. (ed). In sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agriculture Bureau, Farnham. United Kingdom pp. 187-246.
- Hoitink H. A. J. y Fahy P. (1986). Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. Ann. Rev. Phytopathology 24:93-114.
- Huang X., Zhang N., Yong X., Yang X. y Shen Q. (2012). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. Microbiological Research. 167 135– 143.
- Jackson M. L. (1967). (ed). Soil chemical analysis. Prentice Hall, Inc., Engle Wood Cliff. USA.
- Jaizme-Vega M. C., Rodríguez-Romero A. S. y Barroso N. L. A. (2006). Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Fruits 61 151-162 DOI: 10.1051/fruits: 2006013.

- Jankiewicz U. y Koltonowicz M. (2012). The Involvement of *Pseudomonas* Bacteria in Induced Systemic Resistance in Plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48 (3) 244–249.
- Josic D., Delic D., Rasulic N., Stajkovic O., Kuzmanovic D., Stanojkovic A. y Pivic R. (2012). Indigenous pseudomonads from rhizosphere of maize grown on pseudogley soil in Serbia. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 18(12): 197-206.
- Kavitha K., Mathiyazhagan S., Senthilvel V., Nakkeeran S. y Chandrasekar G. (2005). Development of bioformulations of antagonistic bacteria for the management of damping off of Chilli (*Capsicum annum* L.). DOI: 10.1080/0323540040000838.
- Khabbaz S. E. y Abbasi P. A. (2014). Isolation, characterization, and formulation of antagonistic bacteria for the management of seedlings damping-off and root rot disease of cucumber. *Can. J. Microbiol.* 60: 25–33.
- Kämpfer P. y Glaeser S.P. (2012). Prokaryotic taxonomy inn the sequencing era-the poluphasic approach revisited. *Environmental Microbiology*. 14(2):291-317.
- Khalid A., Arshad M. y Zahir Z. A. (2004). Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 473-480.
- Khannous L., Mouna J., Mouna D., Ramzi M., Nour C., Bassem K., Néji G. and Imen F. (2014). Isolation of a novel amylase and lipase-producing *Pseudomonas luteola* strain: study of amylase production conditions. *Lipids in Health and Disease* 13:9.
- Kloepper J. W. y Schroth M. N. (1981). Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopatology* 71:642-644.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablotowicz R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* 7: 39–43.
- LaMontagne M.G., Michel Jr. F.C., Holden P.A. y Reddy C.A. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods* 49(3): 255–264.
- Lardizábal R. 2002. Manejo de semilleros en bandejas. Boletín Técnico Num 4 IDEA. El Salvador. 6p.
- Lessie T.G. y Phibbs P.V. Jr. (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in Pseudomonads. *Annual Review of Microbiology*. 38:359-388.
- Lara M. C., Oviedo Z. L. y Betancur H. C. A. (2011). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootec. Trop.* 29: 187-194.

- Lim J. H. y Kim S. D. (2010). Biocontrol of *Phytophthora* Blight of Red Pepper Caused by *Phytophthora capsici* Using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 Formulations. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 53(6): 766-773.
- López A. V., Bolaños, B. T., de Jesús Yáñez Morales, M., Pacheco, R. P., Escalante, M. Q. (2009). Etiology of pepper wilt disease of 'Chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) in Oaxaca, México | [Etiología de la marchitez del 'Chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México]. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (2): 127-134.
- Loredo O. C., López R. L., Espinosa V. D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22 (2): 225-239.
- Lozano A. N., Guzmán-Plazola R. A., Zavaleta M. E., Aguilar R. V. H., Ayala E. V. (2015). Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annuum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 1(33): 31-53.
- Luna M. L., Martínez P. R. A., Hernández I. M., Arvizu M. S. M. y Pacheco A. J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Rev. Fitotec. Mex.* 36 (1): 63 – 69.
- Martínez-Rojas L. (2015). Respuesta del cultivo de pimentón (*Capsicum annuum*) a la inoculación con *Glomus manihotis* y *Acaulospora lacunosa* en suelo con niveles alto de fosforo. *Cúcuta-Colombia*. 19 (1): 27 – 38.
- Matar S. M., El-Kazzaz S. A., Wagih E. E., El-Diwan A. I., Moustafa H. E., Abo-Zaid G. A., Abd-Elsalam H. E. y Hafez E. E. (2009). Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi, I. *Biotechnology*. 8(1): 53-61.
- Mehetre S. T. y Kale S. P. (2011). Comparative efficacy of thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis* (NR1005) and antagonistic fungi, *Trichoderma harzianum* to control *Pythium aphanidermatum*-induced damping off in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 44 (11): 1068–1074.
- Mehta S. y Nautiyal C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr. Microbiol.* 43: 51-57.
- Melo J., Carolino M., Carvalho L., Correia P., Tenreiro R., Chaves S., Meleiro A. I., de Souza S. B., Dias T., Cruz C. y Ramos A. C. (2016). Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *SpringerPlus* 5:1574. DOI 10.1186/s40064-016-3232-z.
- Mirza M. S., Ahmad W., Latif F., Haurat J., Bally R., Normand P. y Malik K. A. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil* 237:47-54.

- Mohite B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3): 638-649.
- Montero T. V., Guerrero A. B. Z., Anaya L. J. L., Martínez M. T., Guevara O. L. y González C. M. M. (2013). Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(7): 1043-1054.
- Montero L., Duarte C. C. y Cun C. R., Cabrera C. J. A. (2010). Efectividad de biofertilizantes micorrízicos en el rendimiento del pimiento (*Capsicum annuum* L. var. Verano 1) cultivado EN diferentes condiciones de humedad del sustrato. Effectiveness of mycorrhizal biofertilizer on the yield of pepper (*Capsicum annuum* L. var. Verano 1) grown under different conditions of substrate moisture. *Cul. Trop.* 31(3).
- Mojica-Marín V., Luna-Olvera H.A., Sandoval-Coronado C.F., Pereyra-Alfárez B., Morales-Ramos L.H., González-Aguilar N.A., Hernández-Luna C.E., y Alvarado-Gomez O.G. (2009). Control biológico de la marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Phyton* (Buenos Aires), 78(2), 105-110.
- Mridha M. A. U. y Dhar P. P. (2007). Biodiversity of arbuscular mycorrhizal colonization and spore population in different agroforestry trees and crop species growing in Dinajpur, Bangladesh. *Journal of Forestry Research*, 18(2): 91–96 91. DOI: 10.1007/s11676-007-0018-8.
- Nautiyal C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- Nautiyal C.S., Johri J.K. y Singh H. B. (2002). Survival of the rhizosphere competent biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* NBRI2650 in the soil and phytosphere. *Can. J. Microbiol.* 48(7): 588–601.
- Naveed M., Mitter B., Yousaf S., Pastar M., Afzal M. y Sessitsch A. (2014). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biol Fertil Soils* 50:249–262 DOI 10.1007/s00374-013-0854-y.
- Navarro R. A., Berná L. M., Lozano-Carrillo C., Andriano A. y Morte A. (2016). Beneficial native bacteria improve survival and mycorrhization of desert truffle mycorrhizal plants in nursery conditions. *Mycorrhiza* 26: 769. doi:10.1007/s00572-016-0711-6.
- Nemec S., Datno L.E. y Strandberg, J. (1996). Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Prot.* 15, 735–742.
- Noh M. J., Zúñiga A. J. J., Borges G. L., Yam C. C., Godoy H. G. (2014). Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana* 32(4): 273-281.

- Okubaraa P.A., Dickmanb M.B. y Blechl A.E. (2014). Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Plant Science* 228 61–70.
- Omar S. A. (1998). The role of rock phosphate solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiol Biotechnology* 14:211–219.
- Parray J. A., Jan S., Kamili A. N., Qadri R. A., Egamberdieva D. y Ahmad P. (2016). Current Perspectives on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *J Plant Growth Regul* 35:877–902. DOI 10.1007/s00344-016-9583-4.
- Palomo R. M., M. Lujan F., G. Ávila Q. y M. Berzoza M. (2003). Enfermedades radiculares del cultivo del chile (*Capsicum annuum*) y medidas de control. Publicación especial Numero 11. Campo Experimental Valle de Juarez. INIFAP., México. 22p.
- Paredes M. M. y Espinosa V. D. (2009). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28 (1): 61-70.
- Parra G. y Ristaino J. B. (1998). Insensitivity to radomil gold (mefenoxam) Among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight on bell pepper in North Carolina and New Jersey. *Plant disease* 82: 711 p.
- Patiño T. C. y Sánchez de P. M. (2013). Efecto de la aplicación de roca fosfórica y la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el crecimiento del ají (*Capsicum annuum*). Effect of rock phosphate application and inoculation with phosphate solubilizing bacteria on growth of pepper (*Capsicum annuum*). Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Pegg K. y Manners A. (2014). *Rhizoctonia* A variable and versatile nursery pathogen. Nursery levy at work: Nursery Production Plant Health & Biosecurity Project.
- Peña Y. L.P., Ruíz S. E., Barbosa C. J. E. y Reyes R. A. (2016). Isolation of Mexican Bacillus Species and Their Effects in Promoting Growth of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Jalapeño). *Indian J Microbiol* 56(3):375–378. DOI 10.1007/s12088-016-0582-8.
- Pérez H. A., Serrano A. Y., Aguilar P. M. I., Gómez U. R., y Gómez V. J. (2014). Damping-Off and Root Rot of Pepper Caused by *Fusarium oxysporum* in Almería Province, Spain. *Plant Disease* 98:8, 1159-1159.
- Phillips J. M. y Hayman D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of British Mycological Society*, 55: 158–161.
- Pikovskaya R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17, 362-370.

- Podile A. R. y Kishore K. (2007). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Plant associated bacteria. Springer Netherlands: 195–230.
- Raajimakers J.M., Paulitz T.C., Steinberg C., Alabouvette C. y Moëgne-Loccoz Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*. 321 (1-2): 20.
- Ramírez M. R. y Ochoa-Alejo N. (1996). An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Rep.* 16: 226-231.
- Rengel Z. y Marschner P. (2005). Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*, 168: 305–312. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01558.x.
- Rettinassababady C y Jeyalakshmi C. (2014). Bio-Fungicides: The Best Alternative for Sustainable Food Security and Ecosystem. In: R. N. Kharwar et al. (eds.), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security. Part III Microbial Function and Biotechnology*. DOI 10.1007/978-81-322-1801-2_35, © Springer India.
- Reveles H. M., Velásquez V. R., Huchín A. S. y Velásquez V. M. A. (2010). Producción de plántula de chile en almácigos. P. 57–70. In: *Memorias. 1er Foro para productores de chile*. 227 p.
- Richardson A.E., Lynch J. P., Ryan P. R., Delhaize M., Smith F. A., Smith S. E., Harvey P. R., Ryan M. H., Veneklaas E. J., Lambers H., Oberson A., Culvenor R. A. y Simpson R. J. (2011). Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant Soil* 349:121–156. DOI 10.1007/s11104-011-0950-4.
- Rodríguez J, B V Peña O, A Gil M, B Martínez C, F Manzo, L Salazar L. (2007). Rescate *in situ* del chile poblano en Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30: 25-32.
- Rodríguez A. E. A., Bolaños B. M. M. y Menjivar F. J. C. (2010). Efecto de la fertilización en la nutrición y rendimiento de ají (*Capsicum* spp.) en el Valle de Cauca, Colombia. *Acta Agronómica*. 59 (1): 55-64.
- Rojas C. A., Rodríguez D. A. M., Montes V. S. y Pérez J. S. (2010). Evaluación de la promoción de crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Rev. Polibotánica*. 29: 131-147, ISSN 1405-2768; México.
- Rojas B. M. M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas Quorum sensing in beneficial plant-bacteria associations. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XIII (2) 135-143.
- Rojas S. D., Contreras P. M. y Santoyo G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*, 15(2): 36-41.

- Rosas S. B., Pastor N. A., Guiñazú L. B., Andrés J. A., Carlier E., Vogt V., Bergesse J. y Rovera M. (2007). Efficacy of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for improving productivity of several crops. In: Sharma, P. (Ed.), Crop Production Technologies. InTech, pp. 199–210.
- Rylski I. (1986). Pepper (*Capsicum annuum*) In: Handbook of fruit set and development. CRC. UK. p. 341-353.
- Salas M. M. A. (2010). Análisis molecular de la interacción microorganismo benéfico-planta en dos patosistemas: *Trichoderma*-*Arabidopsis* y *Trichoderma*-Tomate. Tesis. Doctor en ciencias en biología molecular. IPICYT.
- Sandoval Ch. R.A., Martínez P.R.A., Hernández I. M., Arvizu M. S., Soto M. L. (2011). Postharvest biological and chemical control of *Fusarium stilboides* on bell pepper (*Capsicum annuum* L.) [Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en poscosecha]. Revista Chapingo, Serie Horticultura 17(2): 161-172.
- SAGARPA (2015). México, líder mundial en exportación de chile. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Comunicado de prensa. Num.721/15.
- Sarabia O. M., Madrigal P. R., Martínez T. M. y Carreón A. Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas, 12(1): 65 – 71.
- Schroth M. N. y Hancock J. G. (1982). Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. Science 216, 1376–1381.
- Schroeder M. S. y Janos D. P. (2005). Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. Mycorrhiza 15: 203–216 DOI 10.1007/s00572-004-0324-3.
- Shahab S., Ahmed N., Khan N. (2009). Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion. Biotechnol Adv 4:1312–1316.
- SIAP (2010). Un panorama del cultivo del chile. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.
- SIAP (2016). Producción agrícola por cultivo. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119?idiom=es>. Consultado en 2016.
- Sieverding E. (1983). Manual de métodos para la investigación de las micorrizas arbusculares en el laboratorio. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali.

- Santos J. P. (2010). Estrategias para el control de *Phytophthora capsici* Leo. y *Fusarium solani* Mart. en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.
- Santoyo G., Valencia C. E., Orozco M. M. C., Peña C. J. J. y Farías R. R. (2009). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 1(28): 53-60.
- Saravanakumar D., Lavanya N., Muthumeena B., Raguchander T., Suresh S. y Samiyappan R. (2008). *Pseudomonas fluorescens* enhances resistance and natural enemy population in rice plants against leaf folder pest. *Journal of Applied Entomology* 132:469–479.
- Smith S.E. y Read D.J. (2008). Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic Press, London.
- Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2:587. doi:10.1186/2193-1801-2-587.
- Shephard M. C. y Wood R. K. S. (1963). The effect of environment, and nutrition of pathogen and host, in the damping off of seedlings by *Rhizoctonia solani*. *Ann. appl. Biol.* 51, 389-402 Printed in Great Britain.
- Sourav S. y Chayanika P. (2016). In vitro Phosphate solubilization by Halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* PHSD5 isolated from Paddy Rhizosphere. *Research Journal of Chemistry and Environment* 20 (5), pp 14-19.
- Subash N., Meenakshisundaram M., Unnamalai N. y Sasikumar C. (2014). Effect of *Trichoderma harizanum* to control damping off disease and growth promotion in chilli (*Capsicum annuum*). *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 4 (2), pp. B1076-B1082.
- Sundaramoorthy S., Raguchander T., Ragupathi N. y Samiyappan R. (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annuum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 60: 59–67.
- Tapia C. y Amaro J. (2014). Género *Fusarium*. *Rev Chilena Infectol*; 31 (1): 85-86.
- Toppo S. R. y Tiwari P. (2015). Biocontrol potentialities of native *Pseudomonas* isolates against plant pathogenic fungi *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp. and *Colletotricum* spp. in tomato rhizosphere under green house condition. *The bioscan* 10(1): 373-377.
- Trivedi P., Pandey A. y Palni L. M. S. P. (2008). In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research* 163: 329-336.
- Tsror L. (2010). Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato. *J Phytopathol* 158:649–658.

- Turner S., Pryer K. M., Miao V. P. y Palmer J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46 (4): 327-338.
- Van der Heijden M. G. A., Bardgett R. D., van Straalen N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11:296–310.
- Van Peer R., Niemann G. J., Schippers B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* strain WCS417r. *Phytopathology*. 81:728–34.
- Varela L. y Trejo. D. (2001). Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*. 39-51.
- Velásquez V.R., Medina A. M.M. y Ruiz J.J.L. (2002). Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(2): 175-181.
- Velásquez V. R., Amador R. M. D., Medina A. M. M., Lara V. F. (2007). Presencia de Patógenos en Almácigos y Semilla de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1): 75-79,
- Velásquez V. R., Reveles-Torres, L.R. y Reveles Hernández, M. (2013). Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el norte centro de México. Folleto Técnico. Núm 50. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, pp 1- 57.
- Velásquez V. R., Reveles H. M. y Reveles T. L.R. (2014). Manejo de enfermedades de los almácigos tradicionales de chile para secado en Zacatecas. Folleto Técnico. Núm 50. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, pp 1-31.
- Valdez R. y otros seis autores 2005. CND nutrient norms for dried “mirasol” type pepper (*Capsicum annuum* L.). Second World Pepper Convention, 150-156.
- Wei G., Kloepper J.W. y Tuzun S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletrotichum orbiculare* by select strains of plant-growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 81:1 508–12.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173 (2):697-703.
- Whipps J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487–511.
- Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J. y van der Lelie D. (2011). Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology Reviews*. 35 (2): 299-323.

- Xu X.-M., Jeffries P., Pautasso M., y Jeger M. J. (2011). Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology*, 101: 1024–1031.
- Yang Y., Bouras N., Yang J., Howard R.J., Strelkov S.E. (2011). Mycotoxin production by isolates of *Fusarium lactis* from greenhouse sweet pepper (*Capsicum annuum*). *International Journal of Food Microbiology* 151 150–156.
- Yamamoto S., Kasai H., Arnold D.L., Jackson R.W., Vivian A., Harayamas S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intergenic structure reconstructed from nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology*. 146:2385-2394.
- Yousaf S. I. y Khalid A.N. (2007). In vitro biological control of *Fusarium oxysporum* - r causing wilt in *Capsicum annuum*. *Mycopath* 5(2): 85-88.
- Yuen G.Y. y Schoneweis S.D. (2007). Strategies for managing *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *International journal of Food Microbiology*, 119: 126-130.