



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA  
EN CHILE JALAPEÑO INOCULADO CON  
AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE  
*Phytophthora capsici* Leo.**

**ISMAEL FERNANDO CHÁVEZ DÍAZ**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2017

La presente tesis, titulada **EXPRESIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA EN CHILE JALAPEÑO INOCULADO CON AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE *Phytophthora capsici* Leo.** realizada por el alumno: **Ismael Fernando Chávez Díaz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA:



\_\_\_\_\_  
DRA. EMMA ZA VALETA MEJÍA

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
DR. SERGIO ARANDA OCAMPO

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
DR. JULIAN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
DR. JOHN LARSEN

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, 17 de Noviembre de 2016**

## **Expresión de respuestas de defensa en Chile Jalapeño inoculado con agentes de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo.**

Ismael Fernando Chávez Díaz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017.

### **Resumen**

La marchitez del Chile causada por *Phytophthora capsici* (Pc) es un problema fitosanitario a nivel mundial. El uso de agentes de control biológico (ACB) asociados a la rizósfera ejerce un efecto directo sobre la sanidad del cultivo al inducir resistencia y controlar las poblaciones de fitopatógenos. Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de 10 bacterias y 11 hongos contra Pc, así como su efecto en el crecimiento de Chile Jalapeño; 2) determinar *in vitro* la compatibilidad entre ACB; 3) evaluar la capacidad protectora de un consorcio de ACB compatibles contra Pc en Chile Jalapeño; y 4) evaluar los niveles de transcritos de los genes *WRKY-a* y *WRKY 1* (ambos factores de transcripción), *PRI* (proteína 1 relacionada a la patogénesis), *GLU* (glucanasas), *CHI* (quitinasas), *POX* (peroxidasas) y *EAS* (5-epiaristoloxeno sintasa) en plantas de Chile Jalapeño inoculadas con un consorcio de ACB. El aislamiento bacteriano S4, que fue identificado como *Pseudomonas putida* mediante un análisis de secuencias multilocus, inhibió el crecimiento *in vitro* de Pc hasta en un 69% ( $P \leq 0.05$ ), y *Trichoderma virens* T01 presentó un 99% de colonización de Pc ( $P \leq 0.05$ ). *Pseudomonas tolaasii* A46 y *Trichoderma atroviride* TOX incrementaron el peso seco en plantas de Chile en un 10% y 36% ( $P \leq 0.05$ ), respectivamente. El consorcio *P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46 redujo la incidencia de la marchitez del Chile en un 76% y la severidad en un 90%, también incrementó el peso seco en un 11% y el área radical en 38%, con respecto al testigo ( $P \leq 0.05$ ). La expresión de todos los genes de defensa evaluados, fue mayor en las raíces de las plantas inoculadas con el consorcio de *P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46, en comparación con las plantas no inoculadas ( $P \leq 0.05$ ). *EAS* fue el gen que alcanzó su máxima expresión con mayor rapidez, 5.14 veces más a las 24 horas posteriores a la inoculación (hpi), mientras que *PRI*, *GLU* y *CHI*, acumularon 6.36, 4.40 y 2.72 veces más transcritos a las 72 hpi.

**Palabras clave:** Compatibilidad entre ACB, interacción planta-microorganismo, genes de defensa en Chile, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas tolaasii*.

## **Defense responses expression in Jalapeño pepper inoculated with biological control agentes of *Phytophthora capsici* Leo.**

Ismael Fernando Chávez Díaz, PhD.

Colegio de Postgraduados, 2017

### **Abstract**

Pepper wilt caused by *Phytophthora capsici* (Pc) is a worldwide phytosanitary problem. The usage of biological control agents (BCA) associated to the rhizosphere exerts a direct effect over crop health by inducing resistance and by controlling plant pathogens populations. This research aimed: 1) to evaluate the antagonistic abilities and growth promotion on Jalapeño pepper seedlings by 10 bacteria and 11 fungal strains. 2) To test compatibility among BCA. 3) To assess the protective capacity by a consortium of BCA on Jalapeño pepper plants. 4) To estimate transcripts levels of the genes *WRKY-a*, *WRKY 1* (both transcription factors), *PRI* (protein 1 related to pathogenesis), *GLU* (glucanases), *CHI* (chitinases), *POX* (peroxidases) y *EAS* (5-epiaristolochene sintasa) in Jalapeño pepper plants inoculated with a consortium of BCA. The bacterial isolate S4, which was identified as *Pseudomonas putida* by a multilocus sequence analysis, inhibited the Pc growth up to 69% ( $P \leq 0.05$ ), and *T. vires* T01 colonized Pc micelium up to 99% ( $P \leq 0.05$ ). Meanwhile *Pseudomonas tolaasii* A46 and *T. atroviride* T0X increased the dry weight of the plant by 10% and 36% ( $P \leq 0.05$ ), respectively. The *P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46 consortium decreased the pepper wilt incidence in 76% and severity in 90%, also it increased the plants biomass in 11% and the radical area up to 38% in respect to the control plants ( $P \leq 0.05$ ). The expression levels was higher for all the evaluated genes in plants inoculated with the *Pseudomonas* consortium, compared to uninoculated plants ( $P \leq 0.05$ ). *EAS* gene reached its maximum expression level more quickly, up to 5.14 fold at 24 hours post inoculation (hpi), meanwhile transcripts accumulation for *PRI*, *GLU* and *CHI* reached 6.36, 4.40 and 2.72 fold at 72 hpi.

**Keywords:** Compatibility among BCA, plant-microorganism interaction, defense genes in chili plants, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas tolaasii*.

## **Dedicatoria**

A simple vista, se puede decir que la tesis doctoral es un documento resultado de un proceso que implica esfuerzo, constancia, el cumplimiento de retos personales y de entrega hacia la búsqueda del conocimiento. Pero, detrás de las líneas que contienen argumentos sólidos, afilados que apenas acarician el velo del saber, se contiene un mundo desconocido para el lector.

En este caso, me es grato dar a conocer, que tras estas líneas, existe una madre que derrumbó el muro de lo imposible para permitir a sus hijos ver del otro lado. Una madre que llenó una infancia del contacto con la naturaleza, que inculcó el respeto a la vida y que con una gracia particular me enseñó que las más grandes formas de comprensión que podemos alcanzar son la paz, la alegría, la compasión y la empatía por el prójimo...

**Gracias eternas a mi madre:**

*Ma. Luisa Díaz Ventura.*

Donde sea que estes, vas siempre conmigo abuelo...

*Jorge Díaz Jimenez*

Admiro tu fortaleza, voy a estar siempre a tu lado...

*Alvaro Chávez Díaz*

## **Agradecimientos**

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía**, por sus consejos, su apoyo y su orientación, sin duda sus aportaciones me cambiaron por completo, me hicieron crecer de forma profesional y personal.

Al **Dr. Sergio Aranda Ocampo**, por compartir su amplia experiencia y conocimientos.

Al **Dr. Alejandro Alarcón**, al **Dr. Julián Delgadillo**, al **Dr. John Larsen** y a la **Dra. Ma. del Pilar Rodríguez**, por su disposición y su aporte, siempre me brindaron excelentes consejos.

A la **Biol. Bárbara Hernández**, por su gran apoyo y por facilitarme trabajar en su laboratorio.

Al próximamente **Dr. Andrés Aguilar Granados**, por su excelente amistad y su paciencia, por sus grandes aportes de forma profesional y personal, por sus ocurrencias e interminables pláticas.

Al próximamente **Dr. Fernando Arce**, un excelente amigo.

A la **Dra. Erika Lagunes**, al **Dr. Moises Camacho**, al **Dr. Edgar Villar**, a la **Dra. Carolina Pérez**, a la **Dra. Olga Rodríguez**, a la **Dra. Reyna Martinez**, al **Dr Yunior Moran**, al **Dr. Maldonado**, a la **M.C. Lupita Hernández**, al **M.C. Manuel Silva**, a la **M.C. Ana Karina Uc**, a la **M.C. Yoana Aguilar**, a la **M.C. Florencia**, al **M.C. Hernan Villar**, a la **M.C. Priscila**, al **Ing. Josue Sánchez**.

Al **Dr. Zacarías Torres** y a sus hijos el **Dr. Helí Torres** y al **Lic. Alberto Torres**.

Agradezco sinceramente a todos aquellos que tuvieron un momento, una plática, un consejo, apoyo, a todos los que directa o indirectamente intervinieron en el proceso de cumplir esta meta.

## **NOTA**

El presente trabajo fue realizado bajo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el otorgamiento de una beca de manutención bajo el número de becario 282970.

## Contenido

	Pág.
Resumen general	iii
Abstract	iv
Lista de cuadros	x
Lista de figuras	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
HIPOTESIS .....	2
OBJETIVO GENERAL.....	2
CAPÍTULO I. El patosistema <i>Capsicum</i> spp. – <i>Phytophthora capsici</i> Leo. y sus agentes de control biológico .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
Introducción .....	4
El oomiceto <i>Phytophthora capsici</i> .....	5
Moléculas de <i>Phytophthora capsici</i> expresadas en su interacción con la planta.....	7
Diversidad de ACB asociados frecuentemente a la rizósfera del patosistema <i>Capsicum</i> spp. – <i>Phytophthora capsici</i> .....	11
Mecanismos de interacción de los ACB con el patosistema <i>Capsicum</i> spp. – <i>Phytophthora capsici</i> .....	15
El hospedante <i>Capsicum</i> spp.....	19
Literatura citada .....	22
CAPÍTULO II Control biológico de <i>Phytophthora capsici</i> y expresión de genes de defensa en chile Jalapeño .....	35
INTRODUCCIÓN .....	35
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
Organismos antagonistas, fitopatógenos y preparación de inóculo .....	38
Antagonismo y promoción de crecimiento vegetal .....	39
<i>Antagonismo in vitro</i> .....	39
<i>Promoción de crecimiento de chile jalapeño</i> .....	42
Actividad fisiológica y compatibilidad entre ACB.....	43
<i>Bioensayos de actividad fisiológica</i> .....	43
<i>Bioensayos de compatibilidad entre ACB</i> .....	43
Bioensayos de control biológico en condiciones de invernadero .....	44

Expresión de genes de defensa en plantas de chile jalapeño .....	46
<i>Establecimiento del bioensayo</i> .....	46
<i>Extracción de RNA total y síntesis de cDNA</i> .....	47
<i>PCR en tiempo real</i> .....	48
Procesamiento y análisis estadístico de los datos .....	50
<i>Análisis estadístico de los datos provenientes de los bioensayos in vitro y en planta, y de PCR en tiempo real</i> .....	50
Caracterización polifásica e identificación de la cepa S4.....	50
<i>Caracterización morfológica de la colonia</i> .....	50
<i>Caracterización bioquímica</i> .....	51
<i>Caracterización molecular</i> .....	51
RESULTADOS .....	55
Antagonismo y promoción de crecimiento vegetal .....	55
<i>Antagonismo in vitro</i> .....	55
<i>Promoción de crecimiento vegetal</i> .....	60
Actividad fisiológica y compatibilidad entre ACB.....	61
<i>Actividad fisiológica</i> .....	61
<i>Compatibilidad entre ACB</i> .....	62
Bioensayos de control biológico en condiciones de invernadero .....	65
Caracterización polifásica e identificación de la cepa S4.....	72
<i>Morfología de la colonia</i> .....	72
<i>Caracterización fisiológica y bioquímica de la cepa S4</i> .....	73
<i>Caracterización genética de la cepa S4</i> .....	75
DISCUSIÓN .....	77
CONCLUSIONES .....	87
LITERATURA CITADA .....	88

## Lista de Cuadros

Cuadros	Página
<b>Cuadro 1.1</b> Diversidad de agentes de control biológico (ACB) usados en diferentes variedades de chile para el control de <i>Phytophthora capsici</i> , sus mecanismos de acción y respuestas de defensa inducidas en la planta.	12
<b>Cuadro 2.1</b> Escala de evaluación de eficiencia parasítica para agentes de control biológico fúngicos.	41
<b>Cuadro 2.2</b> Pruebas de actividad fisiológica.	43
<b>Cuadro 2.3</b> Tratamientos establecidos en el bioensayo de protección bajo condiciones de invernadero.	46
<b>Cuadro 2.4</b> Primers usados para determinar la acumulación relativa de transcritos de genes relacionados con la defensa en plantas de chile jalapeño inoculado con ACB de <i>Phytophthora capsici</i> .	49
<b>Cuadro 2.5</b> Primers usados para amplificación y secuenciación de los genes <i>16s</i> , <i>gyr B</i> , <i>rpo B</i> y <i>rpo D</i> .	53
<b>Cuadro 2.6</b> Inhibición del crecimiento de micelio de cuatro fitopatógenos asociados a la marchitez del chile por ACB bacterianos.	55
<b>Cuadro 2.7</b> Colonización y eficiencia parasítica de ACB fúngicos sobre el micelio de cuatro fitopatógenos asociados a la marchitez del chile.	58
<b>Cuadro 2.8</b> Peso seco de las plantas de chile jalapeño inoculadas con ACB bacterianos y fúngicos.	60
<b>Cuadro 2.9</b> Aptitudes fisiológicas de los agentes de control biológico.	62
<b>Cuadro 2.10</b> Efecto de los ACB sobre la incidencia, severidad, área radical sana y peso seco en plantas de chile jalapeño inoculadas con <i>P. capsici</i>	69
<b>Cuadro 2.11</b> Caracterización morfológica de la cepa S4 en diferentes medios de cultivo.	72
<b>Cuadro 2.12</b> Caracterización fisiológica y bioquímica de la cepa S4.	74
<b>Cuadro 2.13</b> Cepas tipo con alta similitud genética con la cepa S4 mediante secuenciación de los genes <i>16 s</i> , <i>gyr B</i> , <i>rpo B</i> y <i>rpo D</i> .	75

## Lista de Figuras

Figuras	Páginas
<b>Figura 2.1</b> Bioensayos de confrontación entre ACB.	44
<b>Figura 2.2</b> Inhibición del crecimiento micelial de cuatro fitopatógenos (P) asociados a la marchitez del chile por ACB bacterianos (A).	57
<b>Figura 2.3</b> Colonización del micelio de hongos fitopatógenos (P) por ACB fúngicos (A).	59
<b>Figura 2.4</b> Efecto de los ACB sobre el crecimiento de plantas de chile jalapeño.	61
<b>Figura 2.5</b> Interacción compatible entre los ACB bacterianos <i>Pseudomonas putida</i> S4 y <i>Pseudomonas tolaasii</i> A46.	62
<b>Figura 2.6</b> Interacción incompatible entre los ACB bacterianos (S4 y A46) y el ACB fúngico <i>Trichoderma virens</i> T01..	63
<b>Figura 2.7</b> Interacción <i>in vitro</i> entre los ACB bacterianos (S4 y A46) y el ACB fúngico <i>Trichoderma atroviride</i> T0X..	64
<b>Figura 2.8</b> Confrontación <i>in vitro</i> entre <i>Trichoderma virens</i> T01 y <i>Trichoderma atroviride</i> T0X.	65
<b>Figura 2.9</b> Efecto de los ACB sobre la incidencia y severidad de la marchitez de chile jalapeño inoculado con <i>Phytophthora capsici</i> .	67
<b>Figura 2.10</b> Necrosis en raíces y cuello, indicada por la coloración magenta en plantas de chile jalapeño inoculadas con ACB y <i>Phytophthora capsici</i> .	68
<b>Figura 2.11</b> Acumulación relativa de transcritos de genes asociados con defensa en raíces de plantas de chile jalapeño inoculadas con el consorcio de ACB bacterianos <i>Pseudomonas putida</i> S4 y <i>Pseudomonas tolaasii</i> A46.	71
<b>Figura 2.12</b> Morfología de la colonia de la cepa S4 en diferentes medios de cultivo.	73
<b>Figura 2.13</b> Árbol filogenético generado a partir de la concatenación de cuatro genes ( <i>16 s</i> , <i>gyr B</i> , <i>rpo B</i> y <i>rpo D</i> ) para la identificación molecular de la cepa S4 mediante el análisis de secuencias multilocus (MLSA).	76

## INTRODUCCIÓN GENERAL

México es centro de origen, productor y exportador de diversas especies de chile (Mongolporn y Taylor, 2011). Durante la última década el oomiceto *Phytophthora capsici* ha representado el mayor problema fitosanitario para este cultivo en Norte América, incluyendo a México (Lamour *et al.*, 2012). Pese a las medidas de control, las pérdidas no han logrado mitigarse, ya que entre éstas, el abuso en el control químico ha ejercido presión selectiva sobre el fitopatógeno, resultando en el desarrollo de resistencia hacia fungicidas (Lamour *et al.*, 2012). Por lo antes mencionado, es prioritario explorar tecnologías ecológicas y económicamente viables para lograr un manejo sustentable de éste y otros cultivos.

La interacción entre plantas y microorganismos habitantes del suelo, ejerce efectos directos sobre la sanidad, la nutrición vegetal y la supresión de fitopatógenos (Ryan *et al.*, 2009). Se ha evidenciado que diversos agentes bacterianos, fúngicos y micorrízicos tienen potencial de reducir los efectos adversos en este patosistema (Bautista *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2010; Alejo *et al.*, 2007). Los agentes de control biológico (ACB) afectan la dinámica poblacional microbiana, mediante diversos mecanismos como la fijación o solubilización de nutrientes, producción de factores de crecimiento, suprimiendo a fitopatógenos e induciendo resistencia en la planta (Prashar 2013). Al inducirse la resistencia en la planta se expresan diferentes genes que modifican su fisiología y la pueden convertir en un medio hostil para el fitopatógeno. (Castro *et al.*, 2011). Variedades comerciales de chile susceptibles a *P. capsici*, son capaces de incrementar su capacidad defensiva en contra del oomiceto en presencia de agentes de control biológico (ACB) (Park *et al.*, 2013; Veloso y Díaz, 2012; Ezziyyani *et al.*, 2011; Robles-Yerena *et al.*, 2010).

Con base en esta información, en la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis:

### **HIPOTESIS**

Los consorcios conformados por agentes de control biológico compatibles ejercen un mejor efecto de protección y nutrición, e incrementan la capacidad defensiva de la planta de chile.

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la capacidad de protección de complejos de agentes de control biológico (ACB) seleccionados por compatibilidad, así como observar sus efectos sobre la expresión de genes de defensa en plantas de chile Jalapeño

# **CAPÍTULO I. El patosistema *Capsicum* spp. – *Phytophthora capsici* Leo. y sus agentes de control biológico**

## **INTRODUCCIÓN**

México es centro de origen de diversos productos agrícolas de alto valor económico para el mundo, entre éstos se encuentran diferentes variedades de chile (*Capsicum annuum* L.) (Mongkolporn y Taylor, 2011). Aunque éste cultivo se ha extendido a diferentes países, México continua siendo un productor y exportador de gran importancia a nivel mundial (SAGARPA, 2011). Entre las diferentes variedades de chile, el “jalapeño” destaca por su demanda, por lo que se cultiva en todo el país con excepción de Aguascalientes (SIAP, 2010). No obstante, el rendimiento de los cultivos del género *Capsicum* es limitado en gran medida por el oomiceto fitopatógeno *Phytophthora capsici* Leo. (Lamour *et al.*, 2012). La gran versatilidad de *P. capsici* para adaptarse a las condiciones adversas y a las medidas de control utilizadas generando resistencia hacia los agroquímicos, hacen de éste un problema fitosanitario a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012). Entre las alternativas ecológicas para el manejo de *P. capsici*: 1) el uso de genotipos resistentes no tiene el mismo alcance productivo que las variedades comerciales; 2) el desarrollo de variedades que conjunten productividad y resistencia no ha dado resultados favorables, ya que resultan inestables al tratarse de una resistencia de carácter poligénico (Castro-Rocha *et al.*, 2012; Mongkolporn y Taylor, 2011); y 3) el uso de portainjertos tiene resultados limitados, con alta resistencia en el sistema radical pero resistencia moderada en la parte foliar (García-Rodríguez *et al.*, 2010).

La expresión de resistencia en chile es de carácter poligénico. Se ha reportado que en plantas de la línea de chile CM 334, resistente a *P. capsici*, ocurren cambios en la acumulación de transcritos de un conjunto de genes relacionados con la defensa al interaccionar con el oomiceto. Entre estos genes se encuentran: los factores de

transcripción *WRKY-a* y *WRKY1*, que actúan como reguladores reprimiendo o activando genes en la planta al interactuar con su medio (Villar-Luna *et al.*, 2015a; Rushton *et al.*, 2010). Genes que codifican para la expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) como *PRI* (marcador molecular que indica la activación de las respuestas de defensa en la planta), *GLU*, *CHI* (ambas implicadas en la degradación de la pared celular de los fitopatógenos) y *POX* (interviene en la producción de especies reactivas de oxígeno y en el reforzamiento de las paredes celulares) (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Sudisha *et al.*, 2012). El gen *EAS*, clave en la síntesis de la principal fitoalexina en el chile, el capsidiol (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Egea *et al.*, 1996). Varios autores mencionan que éstos genes se encuentran presentes en todas las plantas del género *Capsicum*, y que la regulación positiva o negativa de éstos y otro genes contribuyen en gran medida a que ocurran cambios fisiológicos que inhiben el establecimiento o limitan el avance del patógeno (Castro-Rocha *et al.*, 2012; Zavaleta-Mejía, 2002).

En el caso particular del género *Capsicum*, se han reportado diversos microorganismos bacterias y hongos, incluyendo a los micorrízicos, con capacidad de actuar como agentes de control biológico (ACB) de *P. capsici*. Algunas bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* (Park *et al.*, 2013; Guillén-Cruz, *et al.*, 2006), *Burkholderia* (Ezziyyani *et al.*, 2004a), *Paenibacillus* (Jung *et al.*, 2004), *Serratia* (Shen *et al.*, 2007) *Pseudomonas* (Kim *et al.*, 2000) y *Streptomyces* (Ezziyyani *et al.*, 2004b) son capaces de secretar metabolitos con acción antibiótica, en tanto que los agentes fúngicos como los pertenecientes al género *Trichoderma* son capaces de parasitar al fitopatógeno (Bae, 2011). Adicionalmente, el estímulo biótico generado por estos microorganismos en la rizósfera es detectado por la planta, activando la defensa basal y modificando la expresión de los genes relacionados con la defensa (Narayanasamy,

2013). Se ha observado que durante la interacción de hongos micorrízicos del género *Glomus* con plantas de Chile, se incrementa la expresión del gen *POX*, asociándose con el incremento en la lignificación de paredes celulares (Alejo-Iturvide *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2005; Espinosa-Victoria *et al.*, 2004). Así mismo, se ha registrado el incremento en la acumulación de transcritos de genes de PRs como *PR1* y en la actividad de enzimas como *GLU* y *CHI* en la presencia de diversas especies de *Trichoderma* y de cepas avirulentas de *Fusarium oxysporum* (Veloso y Díaz, 2012; Bae *et al.*, 2011); además, se ha obtenido incremento en la producción de la fitoalexina capsidiol en la presencia de micorrizas y *Trichoderma* (Ozgonen *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2000).

Con base en lo expuesto, en el presente trabajo se probaron algunos ACB con la finalidad de aminorar el impacto de *P. capsici* sobre el cultivo de Chile Jalapeño. Los objetivos de la investigación fueron: 1) Evaluar la capacidad antagónica de 10 aislamientos bacterianos: B3, C6, E4, E11, P3, S5 (no identificados); *Bacillus pumilus* R44; *Pseudomonas tolaasii* A46 y P61; y *P. putida* S4. 10 hongos: *Trichoderma virens* T01, T022, T037 y T046; *T. koningii* T023 y T03; *T. harzianum* T038; *T. viride* T056 y TGC; *T. atroviride* T0X; y un hongo micorrízico (*Rhizophagus intraradices*) contra *P. capsici* y otros fitopatógenos asociados a la marchitez; y su efecto en el crecimiento de Chile Jalapeño. 2) Determinar *in vitro* la compatibilidad entre ACB. 3) Evaluar la capacidad protectora de los consorcios de ACB compatibles contra *P. capsici* en Chile Jalapeño. 4) Evaluar los niveles de transcritos de los genes *WRKY-a*, *WRKY1*, *PR1*, *GLU*, *CHI*, *POX* y *EAS* en plantas de Chile Jalapeño inoculadas con un consorcio de ACB.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Introducción

En 1887, M.V. Galippe, concibe por primera vez que no todos los microorganismos que establecen interacciones simbióticas-parasíticas ejercen efectos deletéreos sobre las plantas (Compant *et al.*, 2012). Posteriormente en 1904, Lorenz Hiltner, desarrolla el concepto de rizósfera, demostrando en sus experimentos la capacidad de los microorganismos para comportarse como simbioses mutualistas, induciendo efectos benéficos en las plantas de gran utilidad para la producción agrícola (Hartman *et al.*, 2008). Así, M.C. Potter demostró por primera vez que dichos microorganismos asociados a las plantas, podían ejercer efectos sobre las poblaciones de fitopatógenos, promoviendo la sanidad vegetal (Hajek, 2004). El uso de organismos vivos con la finalidad de suprimir la densidad poblacional o el impacto de organismos específicos reduciendo su daño sobre los cultivos, constituye la práctica denominada “Control Biológico” (Eilenberg *et al.*, 2001).

Bajo una visión holista, hoy en día se concibe a las plantas como biotopos activos, en donde tienen lugar numerosas interacciones bióticas (Beattie, 2006). Plantas y microorganismos han evolucionado estableciendo interacciones de diferente índole, conservando el equilibrio natural entre poblaciones (Hajek, 2004). A través del tiempo, la microbiota asociada a las especies vegetales se ha vuelto altamente específica y constituye un factor angular que determina el estado de sanidad o enfermedad en el que la planta se encuentre, por lo que puede considerarse como su segundo genoma (Berendsen *et al.*, 2012). Experimentalmente se ha probado que el manejo adecuado de la biodiversidad en la rizósfera ejerce un impacto directo sobre la sanidad, la nutrición vegetal y la supresión de patógenos; beneficios que podrían ayudar a aminorar el uso de agroquímicos y a tener un mayor control de los patosistemas (Ryan *et al.*, 2009).

El género *Capsicum* y el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo. conforman un patosistema complejo que representa un problema fitosanitario en México y el mundo, pues los métodos culturales y químicos de control no han logrado mitigar las altas pérdidas causadas por el fitopatógeno (Pérez-Moreno *et al.*, 2004). Ante el desarrollo de resistencia a fungicidas (Hausbeck y Lamour, 2004) y la creciente necesidad de utilizar tecnologías ecológica y económicamente viables, el uso de recursos microbianos constituye una estrategia factible para lograr un manejo sustentable de los cultivos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006). En México, se tiene evidencia de que algunos agentes bacterianos, fúngicos y micorrízicos tienen potencial para reducir el impacto de *P. capsici* en cultivos del género *Capsicum* (Bautista-Calles *et al.*, 2010; Ramos-Sandoval *et al.*, 2010; Alejo-Iturvide *et al.*, 2008).

#### **El oomiceto *Phytophthora capsici***

La gran aptitud parasítica de los oomicetos se debe a su capacidad para bloquear las respuestas de defensa basal de las plantas, habilidad que los hace fitopatógenos devastadores (Gan *et al.*, 2012). El género *Phytophthora* cuenta con más de 90 especies polivirulentas y altamente agresivas. México es centro de origen de *P. infestans*, agente causal del tizón tardío, al que se le atribuye la causa de la Gran Hambruna Irlandesa en 1804 (Brich y El Cooke, 2013). El primer reporte de *P. capsici* como especie nueva, surge en el otoño de 1918, asociándolo a la aparición de daños en cultivos de la familia *Solanaceae* entre los que figuraba el género *Capsicum* (Leonian, 1922). *Phytophthora capsici* es un oomiceto hemibiotrofo, aun cuando en la planta ocurra la muerte celular como defensa, el oomiceto tiene la capacidad de alimentarse del tejido muerto, por lo que no se detiene la infección (Hardham y Shan, 2009) a menos que las defensas de la planta se expresen con una rapidez y una magnitud que permitan contra restar el ataque del patógeno (Silvar *et al.*, 2008). El rango de hospedantes de este fitopatógeno es amplio e

incluye a especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*), cucurbitáceas, berenjenas y tomates. Recientemente se reportó su capacidad para parasitar frijol ejotero y haba (Lamour *et al.*, 2012). Su éxito como fitopatógeno se debe a las siguientes ventajas evolutivas:

**1) Alta recombinación genética y adaptación.** La especie *capsici* es la única especie heterotálica del género *Phytophthora* con capacidad de completar regularmente su fase sexual por endogamia (Goodwin, 1997). Su tasa de recombinación genética es acelerada, confiriéndole capacidad de adaptación y generación de resistencia ante los diferentes métodos de control (Pérez-Moreno *et al.*, 2004; Parra y Ristiano 2002).

**2) Eficiente diseminación y capacidad de búsqueda.** Forma esporangios desprendibles diseminados fácilmente por agua y viento (Aylor, 2003). Produce zoosporas flageladas móviles capaces de nadar a una velocidad de  $100 \mu\text{m s}^{-1}$ , orientadas por quimiotropismo hacia los gradientes de exudados radicales (Gow, 2004). Se sabe que tanto las zoosporas como las hifas de *P. sojae* responden específicamente a dos isoflavonas (daidzeína y genisteína) excretadas por las raíces de soya (*Glycine max*), mientras que las zoosporas de otras especies de *Phytophthora* no responden a tal estímulo. Es posible que en *P. capsici* ocurra algo similar, ya que sus zoosporas poseen en la membrana una serie de receptores que podrían reconocer de manera específica a las especies de *Capsicum* (Bishop-Hurley *et al.*, 2002). Las zoosporas e hifas también presentan tigmotropismo (que les permite localizar surcos, poros y aberturas naturales) y electrootropismo que las orienta hacia heridas por medio del flujo de iones (Van-West *et al.*, 2002).

**3) Persistencia.** *Phytophthora capsici* no produce clamidosporas (Leonian, 1922), pero produce oosporas con pared celular gruesa, que le permiten sobrevivir hasta por 4

años en el suelo y constituyen la principal fuente de inóculo primario (French-Monar *et al.*, 2007).

**4) Abatimiento de barreras físicas.** Durante la primera etapa de la interacción, la penetración del tejido hospedante la realiza mediante la excreción de una gran cantidad de cutinasas y enzimas pectinolíticas como poligalacturonasas, pectinmetil esterases y pectato liasas que actúan en la pared celular de las células de la planta (Feng *et al.*, 2010).

**5) Resistencia.** Es tolerante a diversos productos considerados como efectivos tales como Acrobat® de NURFAM (dimetomorf) y Gavel® de DOW AGROSCIENCE (zoxamida y mancozeb). El uso indiscriminado de otros como Ridomil® de SYNGENTA en todas sus variantes (metalaxyl, mfenoxam, mezcla de ambos y mezcla de éstos con otros compuestos) ha generado resistencia (Parra y Ristiano, 2002). Además muestra insensibilidad diferencial a compuestos como azoxystrobin, propamocarb, TCMTB (2-tiocianometiltiobezotiasol), metalaxyl y mfenoxam en cepas que podrían estar en contacto de forma natural (Pérez-Moreno *et al.*, 2004).

### **Moléculas de *Phytophthora capsici* expresadas en su interacción con la planta**

*Phytophthora capsici*, es capaz de activar y suprimir la defensa basal de las plantas mediante la producción de moléculas especializadas (Hardham y Shan, 2009) que tienen como propósito facilitar la interacción con su hospedante durante las etapas biotrófica y necrotrófica, y proveerle de un ambiente favorable para su desarrollo y reproducción. Las moléculas implicadas en la interacción entre *P. capsici* y la planta de Chile incluyen las siguientes.

**PAMPs / MAMPs.** Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a microorganismos (MAMPs), son moléculas altamente conservadas que contribuyen al

desempeño biológico general del organismo (Thomma *et al.*, 2011). Sin embargo, son reconocidos por los receptores membranales de la célula hospedante activando la inmunidad de la planta, por lo que también se les conoce como factores de avirulencia o elicitores (Torto *et al.*, 2009). Es decir, son moléculas intrínsecas al microorganismo que delatan su presencia en la planta. Los PAMPs que se han caracterizado en oomicetos son los siguientes:

Hepta-β-glucanas. La pared celular de los oomicetos se compone de celulosa y glucanas, tales compuestos son liberados al germinar las zoosporas. Anteriormente se creía que las plantas en general, incluyendo al género *Capsicum*, contaban con receptores capaces de reconocer estos MAMPs, hoy en día se reconoce que los receptores específicos que los ligan y reconocen están confinados a leguminosas (Côté *et al.*, 2000), por lo que en plantas del género *Capsicum* el reconocimiento parece estar mediado por proteínas PEP-13 de la pared celular del oomiceto (Lamour, 2012).

Péptido PEP-13. Todas las especies de *Phytophthora* presentan en la pared celular proteínas GP42 dependientes de Ca<sup>2+</sup> con actividad transglutaminasa (Brunner *et al.*, 2002). Estas proteínas contienen el motivo PEP-13, que al ser reconocido por receptores específicos dispara la síntesis de fitoalexinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y la muerte celular en plantas no hospedantes que poseen receptores específicos como cilantro y papa (Tör, 2008).

PcNPP1 (Proteína tipo NEP1). NEP1 fue identificada en *Fusarium* como proteínas (P) inductora de necrosis (N) y etileno (E) (Hardham y Shan, 2009), y en 2011 se detectó en oomicetos una proteína que actúa como molécula elicitora de muerte celular, a la que se le llamó proteína (P) de *Phytophthora capsici* (Pc) inductora de necrosis (NP) (PcNPP) (Feng *et al.*, 2011). La proteína PcNPP1 de *P. capsici* actúa como un factor de

virulencia que induce la reprogramación génica de la planta y provoca la muerte celular, permitiéndole al oomiceto pasar de hábitos biotróficos a necrotróficos (Jupe *et al.*, 2013).

Capsiceina. Dentro de la planta, *P. capsici* secreta la elicitorina capsiceina. Dicha molécula consta de una zona altamente hidrofóbica, que le permite interactuar con fosfolípidos de carga negativa de la membrana de la célula vegetal. En la membrana, por medio de interacciones electrostáticas, la capsiceina encapsula a esteroides, como el ergosterol, haciéndolos disponibles para el oomiceto y provocando la disgregación de la membrana celular. Su interacción con el plasmalema supone un estímulo que dispara la respuesta de defensa en la planta (Nespoulos *et al.*, 1999).

Ácido araquidónico. Más del 4.6% de la fracción lipídica polar en los oomicetos está constituida por diversos ácidos eicosapentanóicos (García-Pineda y Lozoya-Gloria, 1999), que son moléculas altamente conservadas y capaces de inducir la producción de fitoalexinas, un incremento notable en la concentración de etileno y la respuesta de hipersensibilidad en plantas (Bostock *et al.*, 2011).

**Efectores.** Son moléculas producidas por el patógeno cuyo efecto en la planta dependerá del genotipo con el cual se establezca la interacción. En plantas susceptibles, actúan como factores de virulencia modificando la estructura y función de la célula para dar paso a la enfermedad; mientras que en plantas resistentes, activan la inmunidad de la planta actuando como factores de avirulencia (Win *et al.*, 2012). Los efectores producidos por simbiontes no patogénicos manipulan a la célula del hospedante para establecer una relación “amigable” (Torto *et al.*, 2009). Cuando el beneficio es mutuo la relación parasítica termina siendo de tipo mutualista, como en el caso de las micorrizas y los endófitos que actúan como agentes de control biológico o promueven el crecimiento de la planta, y cuando en la relación solamente el microorganismo se beneficia sin causarle daño a la planta, la relación parasítica establecida es de tipo comensalista; por ejemplo,

los microorganismos endófitos que no le proporcionan ningún beneficio pero tampoco le infligen daño (Bateman, 1978). A continuación se hace mención de los siguientes efectores que han sido caracterizados en *P. capsici*:

Tipo RXLR. Estos efectores contienen un dominio N-terminal altamente conservado y un motivo RXLR, en donde X corresponde a un péptido señal que promueve el transporte de la molécula efectora a la membrana de la hifa y ésta pueda entonces ser liberada en el citoplasma de la célula hospedante (Hardham y Cahill 2010). Los RXLR modulan y suprimen respuestas de defensa durante la etapa biotrófica y son coadyuvantes de la patogénesis (Brich *et al.*, 2008). En *P. capsici* se han identificado al menos 400 genes putativos relacionados con estas moléculas (Lamour *et al.*, 2012).

Tipo Crinklers. Son efectores análogos a los efectores RXLR, contienen un dominio N-terminal, un motivo tipo LXLFLAK altamente conservado y necesario para su translocación en la membrana, y un dominio C-terminal promotor de la virulencia (Stam *et al.*, 2013). Su blanco son las proteínas del núcleo que podrían estar involucradas en el transporte de ácidos nucleicos y se les relaciona con síntomas de necrosis y epinastia (Hardham y Shan, 2009). Se han identificado 80 genes que parecen codificar para efectores tipo crinklers y más de 200 pseudogenes que analizados computacionalmente, sugieren estar en evolución para codificar este tipo de moléculas (Lamour *et al.*, 2012).

Otros efectores. En *P. sojae* se reportan proteínas inhibidoras de glucanasas (York *et al.*, 2004). La especie *P. infestans* produce inhibidores de proteasas tipo kazal (EPI) que inhabilitan las serin proteasas e inhibidores tipo sistatina que bloquean proteasas tipo papaína (EPIC) en su interacción con jitomate (Tian *et al.*, 2007). Es factible que *P. capsici* también produzca este tipo de efectores.

## **Diversidad de ACB asociados frecuentemente a la rizósfera del patosistema**

### ***Capsicum* spp. – *Phytophthora capsici***

Las plantas se asocian con mayor frecuencia a microorganismos de hábitos copiotrofos y pertenecientes a los phyla Proteobacteria (Gram negativas), Firmicutes (Gram positivas) y Actinobacterias (Buée *et al.*, 2009). Muchos de éstos microorganismos establecen interacciones simbióticas mutualistas con las plantas mediante distintos mecanismos (Ryan *et al.*, 2009). En Chile es frecuente la asociación con especies de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Streptomyces*, las cuales promueven de manera significativa su crecimiento y sanidad (Cuadro 1.1). Los exudados radicales constituyen una fuente simple de carbono, por lo que una gran diversidad de hongos son atraídos por las plantas (Broeckling *et al.*, 2008). *Trichoderma* interacciona exitosamente con las plantas de Chile (Cuadro 1.1) y se caracteriza por su actividad micoparasítica, producción de antibióticos (tricotodermina, tricoteceno, tricorzianina, gliotoxina y gliovirina) (Brozová, 2004), fitohormonas (auxinas) y péptidos activos (alameticina y tricovirina II) que provocan deposición de calosa y síntesis acelerada de fenoles (Mukherjee *et al.*, 2012). Reportes recientes, consignan la capacidad de otros ascomicetos como *Xylaria poitei* y *Fusarium* (no patogénico) para promover la sanidad en plantas de Chile (Cuadro 1.1). Posiblemente el 70% de las plantas se relaciona con hongos micorrízicos del orden *Glomales* (Tarkka *et al.*, 2008), éstos se caracterizan por inducir resistencia y facilitar la toma de nutrientes en diversos cultivos, incluyendo al Chile; por otra parte, se ha observado que su capacidad de secretar glomalina, mejora la estructura del suelo y previene su degradación (Ryan *et al.*, 2009). Los géneros *Glomus* y *Gigaspora* han sido utilizados ampliamente en plantas de Chile con el objetivo de aminorar la acción de fitopatógenos, mostrando excelentes resultados (Cuadro 1.1)

- 1 **Cuadro 1.1.** Diversidad de agentes de control biológico (ACB) usados en diferentes variedades de Chile para el control de *Phytophthora capsici*,  
 2 sus mecanismos de acción y respuestas de defensa inducidas en la planta.

Agente de Biocontrol	Tipo de Chile	Mecanismos Reportados		Objetivo	Referencia
		del ACB	de la planta		
Consorcio (8 actinomicetos)	<i>C. annuum</i>	Antibiosis	-	Protección en invernadero y campo	Bautista-Calles <i>et al.</i> , 2010
<i>Xylaria poitei</i>	Guajillo	Competencia	-	Capacidad de protección	Ramos-Sandoval <i>et al.</i> , 2010
GPUA1 (ascomiceto no identificado)	Guajillo	Antibiosis	-	Protección de plántula	Robles-Yerena <i>et al.</i> , 2010
<i>Glomus fasciculatum</i>	Poblano	ISR	SOD y POX	Decremento de incidencia y severidad	Alejo-Iturvide <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>licheniformis</i> , <i>subtilis</i>	Poblano var. Caballero	Antibiosis	-	Rendimiento, desarrollo y protección de semilla y raíz	Guillén-Cruz <i>et al.</i> , 2006
<i>Glomus intraradices</i>	Jalapeño var. Tres lomos	ISR	POX y CAT	Efecto de protección de premicorrización de la planta	Espinosa-Victoria <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>C. annuum</i>	Micoparasitismo	-	Promoción de crecimiento y salud de la planta	Guigón-López y González-González <i>et al.</i> , 2004
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>C. annuum</i>	ISR y Competencia	PRI, CHI, SC	Protección mediante una cepa no patogénica	Veloso y Díaz, 2012

<i>T. harzianum</i> + <i>Burkholderia cepacia</i>	California Wonder	Micoparasitismo y Antibiosis	-	Sinergismo de los agentes de biocontrol sobre la protección	Ezziyyani <i>et al.</i> , 2011
<i>Burkholderia cepacia</i>	California Wonder	Antibiosis	-	Protección en invernadero y campo	Ezziyyani <i>et al.</i> 2004a
<i>Streptomyces rochei</i>	California Wonder	Antibiosis	-	Búsqueda de nuevos agentes de biocontrol	Ezziyyani <i>et al.</i> 2004b
<i>Trichoderma harzianum</i>	Yolo Wonder	Micoparasitismo	Acumulación de capsidiol	Protección y efecto de la interacción planta-ACB	Ahmed <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus vallismortis</i>	Paldogansan	Antibiosis-ISR	-	Control de diversos patógenos por PGPRs	Park <i>et al.</i> , 2013
<i>Trichoderma ovalisporum</i> , <i>hamatum</i> , <i>theobromicola</i> , <i>stilbohypoxyll</i> , <i>carbbaeum</i>	Bugang	Micoparasitismo y antibiosis	<i>PR1, CHI,</i> <i>POX, HMG2,</i> <i>EAS</i>	Búsqueda de BCA y sus efectos sobre la planta	Bae <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Pimiento Chungok	Antibiosis-ISR	Lignificación	Efectos de interacción planta-ACB	Jung <i>et al.</i> , 2004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pimiento Handbyul	Producción de biosurfactantes	-	Capacidad protectora del ramnolípido	Kim <i>et al.</i> , 2000
<i>Serratia plymuthica</i>	Nok-Kwang	Antibiosis	-	Capacidad biocida y caracterización del ACB	Shen <i>et al.</i> , 2007
<i>Glomus intraradices</i>	Chungok	Competencia	POX, PPO, PAL	Protección por lignificación de paredes	Zheng <i>et al.</i> , 2005
<i>Glomus intraradices</i>	Pimiento Kandil	ISR	-	Efecto de interacción planta-ACB	Cimen <i>et al.</i> , 2009

<i>Bacillus megaterium</i>	Karaisaliscalik	-	-	Rendimiento, protección y solubilización de fosfatos	Akgül y Mirik, 2008
<i>Glomus mosseae,</i> <i>etunicatum, fasciculatum,</i> <i>Gigaspora margarita</i>	Charliston Bagci	ISR y competencia	PAL, CHI, GLU, capsidiol	Efecto de interacción planta-ACB	Ozgonen <i>et al.</i> , 2009; Ozgonen and Erkilic, 2007

1

2 **ACB:** Agentes de Control Biológico; **CAT:** Catalasa; **CHI:** Quitinasas; **EAS:** Epi-5-Aristoluqueno Sintasa; **ISR:** Inducción de Resistencia

3 Sistémica; **POX:** Peroxidasa; **PR1** y **PR4:** Proteínas relacionadas con la patogénesis; **SC:** Sesquiterpeno Ciclasa; **SOD:** Superóxido Dismutasa

## **Mecanismos de interacción de los ACB con el patosistema**

### ***Capsicum* spp. – *Phytophthora capsici***

Los microorganismos habitantes de la rizósfera y del rizoplano poseen diversos mecanismos bioquímicos para desempeñarse en su hábitat e interactuar con la planta y otros organismos (Ryan *et al.*, 2009). Los mecanismos se clasifican en directos e indirectos, los primeros afectan al patógeno o a otras poblaciones microbianas y los segundos a la planta.

a) **Mecanismos directos.** Reflejan la habilidad de los ACB para influir en la dinámica poblacional de la rizósfera, suprimiendo el crecimiento de algunas poblaciones (incluyendo a los patógenos) y favoreciendo la proliferación de otras (Narayanasamy, 2013). Comprenden la secreción de antibióticos y enzimas degradadoras de paredes celulares, la producción de biosurfactantes y sideróforos, y la capacidad de parasitar al patógeno o sus estructuras de resistencia (Prashar *et al.*, 2013).

**Antibiosis.** Potter la observó por primera vez en 1908 (Baker, 1987), en la actualidad se considera como un mecanismo principal debido a su eficiencia para el control de fitopatógenos (Sharma, 2008). Se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios que al ser secretados al medio resultan nocivos, tóxicos o incluso letales para otros microorganismos (Pal y McSpaden-Gardener, 2006); su naturaleza química y diversidad han sido estudiados en géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Trichoderma* (Govindasamy *et al.*, 2010; Brozová, 2004; Raaijmakers *et al.*, 2002). Diversos hongos y bacterias tienen la capacidad de secretar compuestos volátiles, que actúan como antibióticos, inductores de resistencia y como promotores de crecimiento (Tarkka *et al.*, 2008). Entre los compuestos que han exhibido mejores resultados se encuentran el 2,3-butanodiol, la acetoina y la dimetilhexadecilamina (Prashar *et al.*, 2013; Velázquez-Becerra *et al.*, 2010). Otros microorganismos tienen la capacidad de producir

ácido cianhídrico, también llamado cianuro de hidrógeno, que inhibe la cadena transportadora de electrones de los fitopatógenos, al suprimir la actividad de diversas enzimas como la citocromo oxidasa, metaloenzimas y algunos receptores (Reddy, 2013). Este compuesto es producido por varias especies de *Pseudomonas* y por *Chromobacterium violaceum* y se le atribuye una gran eficiencia en el combate contra oomicetos (Ghyselink *et al.*, 2013; Narayanasamy, 2013).

**Producción de biosurfactantes.** Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir y secretar moléculas anfifílicas capaces de formar emulsiones en mezclas acuosas e hidrocarbonadas mediante la reducción de la tensión superficial, que además de poseer propiedades antibióticas, facilitan la interacción planta-bacteria y favorecen la recuperación y mejoramiento de la calidad de los suelos (Sachdev y Cameotra, 2013). Entre los biosurfactantes más estudiados se encuentran los lipopéptidos producidos por los géneros bacterianos como *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas*, y los ramnolípidos (glicoproteínas) son producidos por los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Abdel *et al.*, 2010). Actualmente no se cuenta con registro de biosurfactantes fúngicos estudiados en el patosistema *Capsicum* spp. – *P. capsici*.

**Micoparasitismo y segregación de exoenzimas.** Los hongos micoparasíticos son capaces de penetrar las estructuras vegetativas, reproductivas o de resistencia del fitopatógeno, con la finalidad de obtener nutrientes de éste, provocando frecuentemente su muerte. Dicho mecanismo ha sido ampliamente documentado en especies del género *Trichoderma* aunque también se ha observado en hongos como *Coniothyrium minitans*, *Coprinellus curtus*, *Cladosporium tenuissimum*, *Verticillium lecanii*, oomicetos como *Pythium oligandrum* y diferentes especies de levaduras del género *Pichia* (Narayanasamy, 2013). En el caso de bacterias, los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Serratia* presentan la capacidad de segregar diversas enzimas que

hidrolizan la pared celular de los fitopatógenos (quitinasas, glucanasas, proteasas, lipasas, celulasas) (Prashar *et al.*, 2013; Djuric *et al.*, 2011).

**Producción de Sideróforos.** Mecanismo presente tanto en bacterias como en hongos, que consiste en la producción y secreción de moléculas de bajo peso unidas a aminoácidos no proteicos que forman complejos octaédricos con seis enlaces coordinados, capaces de quelar Fe III (Prashar *et al.*, 2013; Saraf *et al.*, 2011). Dicho mecanismo tiene la finalidad de formar complejos de hierro, que debido a su especificidad para ser reconocidos por receptores transmembranales, no pueden ser absorbidos por otros organismos (Siddiqui, 2005). La secreción de sideróforos contribuye en el control biológico al limitar la biodisponibilidad de Fe en el medio, elemento de gran importancia fisiológica que puede ser un factor limitante para el desarrollo de los organismos (Sayyed *et al.*, 2013; Singh y Singh, 2013).

**b) Mecanismos indirectos.** Incluyen el aporte de nutrientes y factores de crecimiento, así como el incremento de la capacidad defensiva de la planta (ISR, resistencia sistémica inducida) y la competencia por espacio y alimento con otras poblaciones microbianas (Narayanasamy, 2013).

**Aporte de nitrógeno.** El nitrógeno (N) es un nutriente esencial en la transcripción y síntesis de proteínas relacionadas con la defensa. Aun cuando las plantas se encuentran rodeadas en un 78% de N en la atmósfera y el suelo, su capacidad para obtenerlo es limitada por carecer de enzimas como la nitrogenasa. Como estrategia de abastecimiento, éstas lo obtienen a través de sus simbiontes procariontes fijadores de N (Tikhonovich y Provoroy, 2007) o de HMA capaces de aportarles aminoácidos (Bueé, 2009).

**Solubilización de fosfatos.** El fósforo en los suelos se encuentra en formas no disponibles para las plantas, por lo que puede convertirse en una limitante de la salud

vegetal. Las bacterias al secretar ácidos orgánicos favorecen su absorción por las raíces (Barreto *et al.*, 2010). Las micorrizas captan al fósforo mediante grandes proteínas con dominios transmembranales que les permiten la importación de éste como intercambio por protones o sodio en contra de un gradiente electroquímico y posteriormente lo transportan y liberan dentro de la célula vegetal (Jansa *et al.*, 2011).

**Promoción de crecimiento.** Géneros como *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Herbaspirillum* y *Rhizobium* son capaces de sintetizar compuestos tales como las giberelinas, en tanto que *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* sintetizan auxinas como el ácido indol acético (IAA) y el indol acetamida, que promueven efectos benéficos sobre los cultivos (Xue *et al.*, 2013; Babalola, 2010). Los hongos también pueden promover el crecimiento de las plantas mediante la producción de algunas fitohormonas; sin embargo, los mecanismos de promoción de crecimiento por los hongos se relacionan principalmente con el aporte de nutrientes a las plantas (Pandya y Saraf, 2013).

**Degradación de precursores de etileno.** El etileno es una fitohormona con efectos sobre el desarrollo y maduración de células vegetales. Bajo condiciones de estrés biótico y abiótico se genera una mayor actividad de la enzima ACC sintasa, la cual a partir del S-adenosil-monotionina (SAM) produce 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) que posteriormente es convertido en etileno por la ACC oxidasa (Saleem *et al.*, 2007). Las altas concentraciones de etileno tienen efectos adversos para diversos cultivos propiciando incluso el desarrollo de infecciones (Shaharoon *et al.*, 2012). Algunas bacterias son capaces de sintetizar la enzima ACC desaminasa la cual hidroliza el precursor de etileno (ACC) a amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y  $\alpha$ -cetobutirato reduciendo los efectos negativos del etileno (Nadeem *et al.*, 2012).

**Inducción de resistencia.** La resistencia en las plantas puede ser inducida por estímulos bióticos y abióticos, y puede ser una resistencia sistémica adquirida (SAR) o una resistencia sistémica inducida (ISR). La SAR se activa como respuesta a la interacción con fitopatógenos y la aplicación de ciertos compuestos agroquímicos, en tanto que la ISR se activa a partir de la colonización de las raíces por ACB. La SAR es mediada por el ácido salicílico como molécula señal (SA), el cual es producido por la planta en respuesta al ataque del fitopatógeno, con la finalidad de activar varios genes relacionados con la defensa en la planta. La activación de la ISR en las plantas de *Capsicum* es el resultado de la acción coordinada de entre las rutas del etileno (ET) y del metil jasmonato (MeJ), producidos a partir de la interacción con los ACB y que incrementa la capacidad defensiva en diversos tejidos de la planta (Narayanasamy, 2013).

Los mecanismos desplegados por los ACB son complejos, y en la mayoría de los casos un solo microorganismo puede ejercer varios de éstos simultáneamente. Los mecanismos de control de *P. capsici* por ACB reportados con más frecuencia son la antibiosis, el micoparasitismo y la inducción de resistencia (Cuadro 1.1). El éxito del control biológico en este patosistema se debe a la acción dual de los ACB, por un lado debilitando al oomiceto y limitando su habilidad infectiva y por el otro estimulando la capacidad defensiva de la planta.

### **El hospedante *Capsicum* spp.**

*Capsicum* spp. muestra diferentes tipos de defensa: 1) las defensas preformadas o constitutivas, las cuales pueden consistir en barreras físicas (como tricomas, cutículas gruesas, capas de cera y la pared celular) y químicas (como fenoles, alcaloides, fitoalexinas y diterpenoides) que impiden el establecimiento del patógeno; y 2) las defensas inducidas, como la respuesta de hipersensibilidad (muerte celular programada), la deposición de calosa, la lignificación de paredes celulares y el incremento en la

producción y actividad de proteínas específicas relacionadas con la patogénesis (PRs), que dificultan el avance del patógeno en los tejidos del hospedante. Las respuestas de defensa inducidas asociadas más frecuentemente con la resistencia en *Capsicum* spp. son:

**Respuesta de hipersensibilidad (HR).** Proceso caracterizado por una muerte celular rápida alrededor del sitio de infección inducida por el reconocimiento de PAMPs, que impide que los patógenos biótros colonicen el tejido. La respuesta es acompañada por una rápida acumulación de ROS implicados en la red de señalización que da paso a la ISR (Narayanasamy, 2013; Sanzón-Gómez y Zavaleta-Mejía, 2011). En la línea resistente CM334, la rapidez y magnitud con que ocurre este evento, se relaciona estrechamente con la expresión de resistencia (Villar-Luna *et al.*, 2009).

**Fenilalanina amonio liasa (PAL).** Enzima involucrada en la síntesis de compuestos fenólicos (precursores de lignina originada a partir de L-fenilalanina) y de fitoalexinas. En un estudio en donde plantas de Chile fueron confrontadas con varios fitopatógenos se demostró el incremento en los transcritos de esta enzima; así mismo, se relacionó directamente con el incremento del ácido salicílico y con la adquisición de resistencia (Kim y Hwang, 2014).

**5-*epi*-aristoloqueno sintasa (EAS).** Es una enzima sesquiterpeno ciclasa que sintetiza a la fitoalexina capsidiol en respuesta a la detección de MAMPs y PAMPs. El capsidiol es capaz de degradar los fosfolípidos de la membrana de *P. capsici* afectando su permeabilidad (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008).

**PR2, proteínas tipo  $\beta$ -1,3 glucanasa (GLU).** El polímero  $\beta$ -1,3-D-glucano formado en su mayoría por enlaces  $\beta$ -1,3-glucosa, se encuentra como constituyente en las paredes celulares de oomicetos y hongos (Côté *et al.*, 2000). Las PR2 presentes en las

plantas hidrolizan esos enlaces, degradando la pared celular del fitopatógeno limitando así su establecimiento (Fernández-Herrera *et al.*, 2012).

**PR3, proteínas tipo quitinasa (CHI).** Las paredes celulares de hongos, exoesqueletos de insectos, huevos y cutícula externa de nematodos se conforman de quitina (Curtis *et al.*, 2011). Las quitinasas secretadas por las plantas hidrolizan la quitina ( $\beta$ -1,4 *N*-acetilglucosamina) en oligómeros de bajo peso molecular (Dahiya *et al.*, 2006). También tienen actividad de muramidasa por lo que hidrolizan los peptidoglucanos de las paredes celulares bacterianas; debido a esto, se considera que las quitinasas están implicadas en los procesos de defensa contra hongos, bacterias y tal vez de insectos y nematodos (Dahiya *et al.*, 2006; Curtis *et al.*, 2011).

**PR9, proteínas tipo peroxidasa (POX).** Enzimas multifuncionales, que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidan compuestos fenólicos para polimerizarlos y lignificar las paredes celulares; producen ROS con actividad antimicrobiana, participan en la RH y reestablecen heridas en el proceso de suberización (Passardi *et al.*, 2004).

**Otras proteínas de interés en la expresión de resistencia.** Otras proteínas que muestran cambios en su expresión o actividad como respuestas de defensa en Chile son: Polifenol oxidasa (PPO o catecol oxidasa), oxida un amplio rango de compuestos fenólicos produciendo compuestos tóxicos, ROS y participando en el engrosamiento de paredes celulares. El incremento en expresión y actividad de esta enzima se ha observado en respuestas a heridas ocasionadas por herbívoros y al ataque por hongos fitopatógenos (Abdin, 2013). Hidroximetil glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoAR), que cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato en la ruta de los isoprenoides, dirigiéndolo a la síntesis de fitoesteroles (sí la enzima ha sido producto del gen *Hmg1*) o bien de fitoalexinas (sí la enzima ha sido expresada por el gen *Hmg2*) (Ha *et al.*, 2003). Dependiendo del gen expresado, se puede favorecer el desarrollo de *P. capsici* (*Hmg1*)

ya que este necesita fitoesteroles (Weete *et al.*, 1989) o bien, limitarlo al desviar la ruta mevalónica a la síntesis de fitoalexinas (*Hmg2*) (Zavaleta-Mejía, 2002). Catalasa (CAT), que se sintetiza en respuesta al reconocimiento de MAMPS, la enzima catalasa bloquea la inducción de muerte celular al reducir el estrés causado por las ROS (Lamb y Dixon, 1997). Por otra parte, mediante la tecnología de microchips se encontró que en variedades resistentes como CM 334 ante la interacción con *P. capsici* tres genes se reprimieron y 19 se sobre-expresaron, de estas últimas destacan los genes de tres proteínas de las que se desconoce su función específica (ZR1, U-LIM y una proteína de la pared celular) (Richins *et al.*, 2010).

Ante el problema fitosanitario que *Phytophthora capsici* representa para la producción de chile en nuestro país, la presente investigación tuvo la finalidad de contribuir al conocimiento del control biológico como una alternativa sustentable, viable y factible para el control de enfermedades de la raíz como la marchitez del chile.

### **Literatura citada**

- Abdel, M.A.M., Lépine, F., Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86:1323-1336.
- Abdin, M.Z., Khan, M.A., Ali, A. Alam, P., Ahmad, A., Sarwat, M. (2013). Signal transduction and regulatory networks in Plant-Pathogen Interaction: A proteomics perspective. *In: Stress signaling in plants: Genomics and proteomics*. (Eds.) M Sarwat *et al.* Ed. Springer. New Delhi, India. P.p. 69-90.
- Ahmed, A.S., Pérez C.S. Candela, M.E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*. 106:817-824.
- Akgül, D.S. and Mirik, M. (2008). Biocontrol of *Phytophthora capsici* pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology*. 90:29-34.

- Alejo-Iturvide, F., Márquez-Lucio, M.A., Morales-Ramírez, I., Vázquez-Garcidueñas, M.W., Olalde-Portugal, V. (2008). Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. *European Journal of Plant Pathology*. 120:13-20.
- Aylor, D.E. (2003). Spread of plant disease on a continental scale: role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology*. 84:1989-1997.
- Babalola, O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*. 32: 1559-1570.
- Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.S., Strem, M.D., Park, S.C., Ryu, C.M., Melnick, R.L. Bailey, B.A. (2011). Endophytich *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24:336-351.
- Baker, K.F. (1987). Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Plant Pathology*. 25:67-85
- Barreto, M.D.V., Seldin, L., de Araujo, F.F., Ramos L.R. (2010) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. *In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs*. (Ed.) Maheshwari, D.K. Ed. Singer-Verlag Berlin Heidelberg. 21-43.
- Bateman, D. F. (1978). The Dynamic Nature of Disease. Chapter 3. *In: Plant disease and advanced treatise Volume III*. (Eds) Horsfall, J.G. and E.B. Cowling. Ed. Academic Press, New York. 53-83
- Bautista-Calles, J., García-Espinosa, R., Zavaleta-Mejía, E., Pérez-Moreno, J., Montes-Blmont, R, Ferrera-Cerrato, R., Huerta-Lara, M. (2010). Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora cpasici* Leo.) con complejidad ascendente de antagonistas en el sustrato de germinación de chile (*Capsicum annum* L.). *Interciencia*. 35:613-618.
- Beattie, G.A. (2006). Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. *In: Plant-Associated Bacteria*. (Ed) S.S. Gnanamanickam Ed. Springer. Netherlands. Pp. 1-56
- Berendsen, R.L., Peters, C.M., Bakker, P.A. (2012). The rhizosphere microbe and plant health. *Trends in Plant Science*. 17:478-486

- Bishop-Hurley, S.L., Mounter, S.A., Laskey, J., Morris, R.O., Elder, J., Roop, P., Rouse, C., Schmidt, F.J., English, J.T. (2002). Phage-Displayed peptides as developmental agonists for *Phytophthora capsici* zoospores. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3315-3320.
- Bostock, R.M., Savchenko, T., Lazarus C., Dehesh, K. (2011). Eicosapolyenoic acids. Novel MAMPs with reciprocal effect on oomycete-plant defense signaling networks. *Plant Signaling & Behavior*. 6:531-533.
- Brich, P.R.J., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Hein, I., Pritchard, L., Whisson, S.C. (2008). Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:337-379.
- Brich, P.R.J., EL Cooke, D. (2013). The early days of late blight. *eLife*. 2:e00954
- Broeckling, C.D., Broz, A.K., Bergelson, J., Manter, D.K., Vivanco, J.M. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:738-744.
- Brozová, J. 2004. Mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. in plant protection. *Plant Protection Science*. 40:63-74.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., Nümberger, T. (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *European Molecular Biology Organization Journal*. 21:6681-6688.
- Bueé, M., De Boer, W., Martin, F., van Overbeek, L., Jurkevitch, E. (2009). The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and soil*. 321:189-212.
- Castro-Rocha, A., Fernández-Pavía, S.P., Osuna-Ávila, P. (2012). Chili defense mechanisms in the *Capsicum annuum-Phytophthora capsici* pathosystem. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30:49-65.
- Cimen, I., Pirinc, V., Sagir, A., Akpınar, C., Guzel, S. (2009). Effect of solarization and vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (VAM) on phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Lenonian) and yield in pepper. *African Journal of Biotechnology*. 8:4884-4894.

- Compant. S., Sessitsch, A., Mathieu, F. (2012). The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria – a tribute to M.L.V. Galippe. *Plant and Soil*. 356:299-301
- Côté, F., Roberts, K.A., Hahn, M.G. (2000). Identification of high-affinity binding sites for the hepta- $\beta$ -glucoside elicitor in membranes of model legumes *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Planta*. 211:596-605.
- Curtis, R.H.C., Jones, J.T., Davies, K.G., Sharon, E., Spiegel Y. (2011). Plant nematode surfaces. *In: Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence Between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms*. Eds. K. Davies y Y. Spiegel. Springer. P.p. 115-144.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:773-782.
- Djuric, S., Pavic, A., Jarak, M., Pavlovic, S., Starovic, M., Pivic, R., Josic, D. (2011). Selection of indigenous fluorescent pseudomonad isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Romanian Biotechnological Letters*. 16:6580-6590.
- Egea, C., Alcazar, M.D., Candela, M.E. (1996). Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*. 98:737-742.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46:387-400.
- Espinosa-Victoria, D., González-Mendoza, D., Placencia-de la Parra, J., García-Espinosa, R. (2004). Reducción de la incidencia de *Phytophthora capsici* Leo. en el sistema radical de plantas de chile pre-micorrizadas con *Glomus intraradices*. *TERRA Latinoamericana*. 22:317-326.
- Ezziyyani, M., Hamdache, A., Requena, A., Egea-Gilbert, C., Candela, M.E., González-Ramiro, L., Requena M.E. (2011). Mejora de la capacidad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de un combinado de antagonistas compatibles frente a *Phytophthora capsici* Leonian. *Anales de Biología*. 33:67-77.
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Requena, M.E., Ahmed, A.S., Candela M.E. (2004a.) Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. *Anales de Biología*. 26:61-68.

- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Requena, M.E., Rubio, L., Candela, M.E. (2004b). Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Annales de Biología*. 26:69-78.
- Feng, B., Li, P., Wang, H., Zhang, X. (2010). Functional analysis of *Pcpme6* from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis*. 49:23-31.
- Feng, B.Z., Li, P.Q., Fu, L., Sun, B.B., Zhang, X.G. (2011). Identification of 18 genes encoding necrosis-inducing proteins from the plant pathogen *Phytophthora capsici* (Pythiaceae:Oomycetes). *Genetics and Molecular Research*. 10:910-922.
- Fernández-Herrera, E., Rojas-Martínez, R.I., Gómez-Rodríguez, O., Guevara-Olvera, L., Rivas-Davila, M.E., Valdez-Moctezuma, E. Zavaleta-Mejía, E. (2012). Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici*. *Interciencia*. 37(5):370-376.
- French-Monar, R.D., Jones, J.B., Ozores-Hampont, M., Roberts, P.D. (2007). Survival of inoculum of *Phytophthora capsici* in soil trough time under different soil treatment. *Plant Disease*. 91:593-598.
- Gan, P.H.P., Dodds, P.N., Hardham, A.R. (2012). Plant infection by biotrophic fungal and oomycete pathogens. *In: Signaling and Communication in Plant Symbiosis*. Eds. Perotto, S. y F. Baluska. Springer Verlag. Pp. 183-212.
- García-Pineda, E., Lozoya-Gloria, E. (1999). Induced gene expression of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid (ACC oxidase) in pepper (*Capsicum annum* L.) by arachidonic acid. *Plant Science*. 145:11-21.
- García-Rodríguez, M.R., Chiquito-Almanza, E., Loeza-Lara, P.D., Godoy-Hernández, G., Villordo-Pineda, E., Pons-Hernández, L., González-Chavira, M.M., Anaya-López, J.L. (2010). Producción de chile ancho injertado sobre criollo de morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia*. 44:701-709
- Ghyselinck, J., Velivelli, S.L., Heylen, K., O’Herilhy, E., Franco J., Rojas, M., De Vos, P., Prestwich, B.D. (2013). Bioprospecting in potato fields in the central Andean Highlands: Screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. *Systematic and Applied Microbiology* 36:116-127.
- Goodwin, S.B. (1997). The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*. 87:462-473.

- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Magheshwaran, V., Kumar, U., Bose, P., Sharma, V., Annapurna, K. (2010). *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for sustainable agriculture. *In: Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Ed. D.K. Maheshwari. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp 333-364.
- Gow, N.A. (2004). New angles in mycology: studies in directional growth and directional motility. *Mycological Research*. 108:5-13.
- Guigón-López., C., González-González, P.A. (2004). 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*. 22:117-124.
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F.C., 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*. 24:105-114.
- Ha, S.H., Kim, J.B., Hwang, Y.S., Lee, S.W. (2003). Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1625:253-260.
- Hajek, A.E. (2004). Introduction to biological control. *In: Natural enemies: An introduction to biological control*. (Ed) Sanderson, T. Ed. Cambridge University. United Kingdom. Pp. 19-35.
- Hardham, A.R. Shan, W. (2009). Cellular and molecular biology of *Phytophthora*-Plant Interactions. *In: Plant Relationships*, 2<sup>nd</sup> Edition The Mycota V. Ed. Deising H. Springer-Verlag Berlin. Pp. 3-27.
- Hardham, A.R., Cahill, D.M. (2010). The role of oomycete effectors in plant-pathogen interactions. *Functional Plant Biology*. 37:919-925.
- Hartmann, A., Rothballer, M. Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*. 312:7-14.

- Hausbeck, M.K., Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenge. *Plant Disease*. 88:1292-1303.
- Hernández-Rodríguez., A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez-del Valle, M.G., Hernández-Lauzardo, A.N. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24:42-49.
- Jansa, J., Finlay, R., Wallander, H., Smith, F.A., Smith, S.E. (2011). Role of Mycorrhizal Symbioses in Phosphorus Cycling. *In: Phosphorus in Action*. (Eds) Bünemann, E.K. *et al.* Ed Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 137-168.
- Jung, W.J., Jin Y.L., Kim, Y.C., Kim, K.Y., Park, R.D., Kim, T.H. (2004). Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes and induction of the isoenzymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biological Control*. 30:645-652.
- Jupe, J., R. Stam, A., Howden, A.J.M., Morris, J.A., Zhang, R., Hedley, P.E., Huitema, E. (2013). *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology*. 14:R63.
- Kim, B.S., Lee J.Y., Hwang, B.K. (2000). *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Management Science*. 56:1029-1035.
- Kim, D.S., Hwang, B.K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*. 65:2295-2306.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:251-275.
- Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*. 13:329-337.
- Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology* 12:401-408.
- López-Martínez, N., Colinas-León, M.T., Peña-Valdivia, C.B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, Patricia, Biesaga, M., Zavaleta-Mejía, E. (2011). Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora cpasici* Leo. *Plant and Soil*. 338:399-409.

- Maldonado-Bonilla, L.D., Betancourt-Jimenez, M., Lozoya-Gloria, E. (2008). Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology*. 121:439-449.
- Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. (2011). *Capsicum*. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Vegetables*. (Ed) Kole, C. Ed. Springer-Verlag. Berlin. Pp. 43-57.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Zachow, C., Berg, G., Zeilinger, S. (2012). *Trichoderma*-Plant-Pathogen interactions: Advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology*. 52(4):522-529.
- Nadeem, S.M., Ahmad, M., Zahir, Z.A., Ashraf, M. (2012). Microbial ACC-Deaminase Biotechnology: Perspectives and Applications in Stress Agriculture. In: *Bacteria in Agrobiolology: Stress Management*. Ed. Maheshwari, D.K. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 141-185
- Narayanasami, P. (2013). Mecanismos of action of bacterial biological control agents. In: *Biological Management of Diseases of Crops*. Ed. Hokkanen, H.M.T. Springer. Londres. Pp. 295-429.
- Nespoulous, C., Gaudemer, O., Huet, J.C., Pernollet, J.C. (1999). Characterization of elicitor-like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate. *FEBS letters*. 452:400-406.
- Ozgonen H., Erkilic, A. (2007). Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungus inoculation in pepper. *Crop Protection*. 26:1682-1688.
- Ozgonen, N., Yardimci, Y., Kilic, H.C. (2009). Induction of phenolic compound and pathogenesis-related proteins by mycorrhizal fungal inoculation against *Phytophthora capsici* Leonian in pepper. *Pakistan Journal of Biological Science*. 12:1181-1187.
- Pal, K.K., McSpadden G.B. (2006). Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. 1-25
- Pandya, U., Saraf, M. (2013). Integrated Diseases Management in Groundnut for Sustainable Productivity. In: *Bacteria in Agrobiolology: Crop Productivity*. (Eds) Maheshwari, D.K. *et al.* Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 351-377.

- Park, J.W., Balaraju, K., Kim, J.W., Le, S.W., Park, K. (2013). Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biological Control*. 65:246-257.
- Parra, G., Ristiano, J.B. (2002). Resistan to mefenoxam and metalaxyl amog fields isolates of *Phytophthora capsici* causin *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease*. 85:1069-1075.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*. 9:534-540
- Pérez-Moreno, L., Durán-Ortíz, L.J., Ramírez-Mondragón, R., Sánche-Pale, J.R., Olalde-Portugal, V. (2004). Compatibilidad y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:19-25
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. (2013). Biocontrol of plant pathogens using plant growth promoting bacteria. *In: Sustainable Agriculture Reviews*. (Ed.) E. Lichtfouse. Ed. Springer Science + Busines Media Dordrecht. India. Pp. 319-360.
- Raaijmakers, J.M., Vlami, M. & de Souza, J.T. Antonie Van Leeuwenhoek (2002) Antibiotic Production by Bacterial Biocontrol Agents. 81: 537. doi:10.1023/A:1020501420831
- Ramos-Sandoval, R.U., Gutiérrez-Soto, J.G., Rodríguez-Guerra, R., Salcedo-Martínez, S.M., Hernández-Luna, C.E., Luna-Olvera, H.A., Jiménez-Bermont, J.F., Fraire-Velázquez, S., Almeyda-León, I.H. (2010). Antagonismo de dos ascomicetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:75-86.
- Reddy, P.P. (2013). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). *In: Recent Advances in Crop Protection*. Springer India. Pp. 131-158
- Richins, R.D., Micheletto, S., O'Connell, M.A. (2010). Gene expression profiles unique to chile (*Capsicum annuum* L.) resistant to *Phytophthora* root rot. *Plant Science*. 178: 192-201.
- Robles-Yerena, L., Rodríguez-Villareal, R.A., Ortega-Amaro, M.A., Fraire-Velázquez, S., Simpson, J., Rodríguez-Guerra, R., Jiménez-Bermont, J.F. (2010). Characterization of a new fungal against *Phytophthora capsici*. *Sientia Horticulturae*. 125:248-255.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*. 15:247-258.

- Ryan, P.R., Dessaux, Y., Thomashow, L.S., Weller, D.M. (2009). Rhizosphere engineering and management for sustainable agriculture. *Plant and Soil*. 321:363-383.
- Sachdev, D.P., Cameotra, S.S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97:1005-1016.
- SAGARPA. 2011. Mantiene México liderazgo como exportador de Chile: SAGARPA. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B278.aspx>. Consultado el 6 de Noviembre, 2012.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34:635-648
- Sanzón-Gómez., D., Zavaleta-Mejía, E. (2011). Respuesta de hipersensibilidad, una muerte programada para defenderse del ataque por fitopatógeno. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29:154-164.
- Saraf, M., Rajkumar, S., Saha, T. (2011). Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. *In: Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems*. (Ed) D.K. Maheshwari. Ed. Springer-Verlag. Berlin. Pp. 361-385.
- Sayyed, R.Z., Chincholkar, S.B., Reddy, M.S., Gandrude, N.S., Patel, P.R. (2013). Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. *In: Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. (Ed) Maheshwari D.K. Ed Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 449-471.
- Shaharoon, B., Arshad, M., Waqas, R., Khalid, A. (2012). Role of ethylene and plant growth-promoting rhizobacteria in stressed crop plants. *In: Crop Stress and Managment: Perspective and Strategies*. (Ed) Venkateswarlu, B. *et al.* Ed. Sprimnger Science+Business Media B.V. 429-446.
- Sharma, A. 2008. Rhamnolipid-Producing PGPR and their role in damping-off disease suppression. *In: Plant-Bacteria interactions: Strategies and techniques to promote plant growth*. (Eds.) Ahmad, I., Pichtel, J. y Hayat, S. Ed. Wiley-VCH. Alemania. Pp. 213-233
- Shen, S.S., Piao, F.Z., Lee, B.W., Park, C.S. (2007). Characterization of antibiotic substance produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the biological control

- activity against pepper phytophthora blight. *Plant Pathology Journal*. 23(3):180-186.
- SIAP. 2010. Un panorama del cultivo del chile. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>. Consultado el 8 de Marzo, 2013.
- Siddiqui, Z.A. (2005). PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. *In: PGPR: Biocontrol and biofertilization*. (Ed.) Z.A. Siddiqui. Ed. Springer. Netherlands. Pp. 111-142.
- Silvar, C., Merino, F., Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*. 165:1120-1124.
- Singh, J.S., Singh, D.P. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Microbes in sustainable agriculture. *In: Management of microbial resources in the environment*. (Eds) A. Malik *et al.* Ed. Springer Scienci + Business Media Dordrecht. Pp. 361-385.
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A.J.M., Morris, J.A., Bovenik, P.C., Heldey, P.E., Huitema, E. (2013). Identification and characterization CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity. *PLoS ONE* 8(3): e59517. En línea:  
<http://www.plosone.org/article/citationList.action?articleURI=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0059517>
- Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A. Shetty, H.S. (2012). Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. *In: Plant Defense: Biological Control*. (Eds.) Mérillon, J.M., Ramawat, K.G., Ed Springer Science+Business Media B.V. Pp. 379-403.
- Tarkka, M., Shrey, S., Hampp, R. (2008). Plant Associated Soil Micro-organisms. *In: Molecular Mechanisms of Plant and microbe Coexistence*. (Eds.) C.S. Nautiyal y P. Dion. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 3-51
- Thomma, B.P., Nürnberger, T., Joosten M.H. (2011). Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* January. 23:4-15.

- Tian, M.Y., Win, J., Song, J., van Der, H.R., van Der, K.E., S. Kamoun, S. (2007). A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiology*. 143:364-377.
- Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A. (2007). Beneficial plant-microbe interactions. In: *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Eds. Dyakov, Y.T., Dzhavakhiya, V.G. y Korpela, T. Elsevier. Amsterdam, Holanda. 365-420.
- Tör, M. (2008). Tapping into molecular conversation between oomycete plant pathogens and their hosts. *European Journal of Plant Pathology*. 122:57-69.
- Torto A., T., Collmer, C.W., Lindeber, M., Bird, D., Collmer, A., Tyler, B.M. (2009). Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant simbiotes described using the Gene Ontology. *BMC Microbiology*. 9:1-8.
- van West, P., Morris, B.M., Reid, B., Appiah, A.A., Osborne, M.C., Cambell, T.A., Shepherd, S.J., Gow, N.A.R. (2002). Oomycete plant pathogen use electric fields to target roots. *Molecular Plant-Microorganism Interaction*. 15:790-798.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, L.I., López-Bucio, José., Flores-Cortez, I., Pizano, G.S., Valencia-Cantero, E. (2010). Actividad inhibitoria del compuesto volátil bacteriano dimetilhexadecilamina sobre fitopatógenos. *Biológicas*. 12:96-101.
- Veloso, J., Díaz, J. (2012). *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahlia* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defense genes. *Plant Pathology*. 61:281-288.
- Villar-Luna, E., García-Espinoza, J.A., Gómez-Rodríguez, O., Rojas-Martínez, R.I., Zavaleta-Mejía, E. (2015a). Defense gene expression in root galls induced by *Nacobbus aberrans* in CM334 chilli plants. *Helminthologia*. 52:77-82.
- Villar-Luna, H., Reyes-Trejo, B., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., Zavaleta-Mejía, E. (2015b). Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción incompatible chile CM334/*Nacobbus aberrans* e incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematropica*. 45:9-19.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R.I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A.M., Zavaleta-Mejía, E. (2009). Respuesta hipersensitiva

- en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobus aberrans*. *Nematropica*. 39:143-155.
- Weete, J.D., Fuller, M.S., Huang, M.Q., Gandhi, S. (1989). Fatty Acids and sterols of selected hyphochytriomycetes and chytridiomycetes. *Experimental Mycology*. 13:183-195.
- Win, J., Chaparro-García, A., Belhaj, K., Saunders, D.G., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S.A., Kamoun, S. (2012). Effector biology of plant-associated organisms: Concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* 77:235-47. doi: 10.1101/sqb.2012.77.015933.
- Xue, L., Xue, Q., Chen, Q., Lin, C., Shen, G., Zhao, J. (2013). Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. *Crop Protection*. 43:231-240.
- York, W.S., Quin, Q., Rose, J.K. (2004). Proteinaceous inhibitors of *endo*- $\beta$ -glucanases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1696:223-233.
- Zavaleta-Mejía., E. (2002). Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:118-122.
- Zheng, H., Cui, C., Zhang, Y., Wang, D., Jing, Y., Kim, K.Y. 2005. Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University Science*. 68:778-786.

## **CAPÍTULO II Control biológico de *Phytophthora capsici* y expresión de genes de defensa en chile Jalapeño**

### **INTRODUCCIÓN**

El chile (*Capsicum annuum* L.) es un producto hortícola de amplia importancia económica, cultural y gastronómica en México. Entre las variedades cultivadas, el “Jalapeño” destaca por su alta demanda para consumo nacional y exportación (SAGARPA, 2011). No obstante, la enfermedad conocida como marchitez del chile figura como el principal factor limitante llegando a provocar pérdidas totales (SIAP, 2010). El oomiceto *Phytophthora capsici* Leo. es reconocido como el principal agente causal de la enfermedad de marchitez en chile, aunque también se asocia a otros fitopatógenos como *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Mongkolporn y Taylor, 2011). Pese a las medidas de control que se aplican, con frecuencia las pérdidas no han logrado mitigarse. El control químico ha ejercido presión selectiva que ha resultado en el desarrollo de resistencia a fungicidas (Lamour *et al.*, 2012). Actualmente, la marchitez del chile es una de las principales enfermedades que se presentan en cultivos del género *Capsicum* a nivel mundial, lo que hace necesario explorar tecnologías ecológicas y económicamente viables para lograr un manejo sustentable de éste y otros cultivos.

El uso de agentes de control biológico (ACB) bacterianos, fúngicos y micorrízicos ha mostrado potencial para reducir los efectos adversos causados por *P. capsici* en diversos cultivos. En particular en el cultivo de chile, bacterias Gram positivas del género *Bacillus* (Guillén-Cruz *et al.* 2006), Gram negativas fluorescentes del género *Pseudomonas* (Kim *et al.*, 2000), hongos del género *Trichoderma* (Ahmed *et al.*, 2000) e incluso cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* (Veloso y Díaz, 2012) han mostrado resultados alentadores. La capacidad de producir antibióticos, ramnolípidos y

fitohormonas, de parasitar a otros microorganismos o inducir resistencia en la planta, permite a estos ACB ejercer efectos directos sobre la fisiología y la sanidad del cultivo, así mismo sobre las poblaciones de microbiota nativa y otros ACB presentes. Actualmente los estudios de control biológico tienden a incluir a más de un ACB con la finalidad de aprovechar los diversos mecanismos de control que exhiben (Bautista-Calles *et al.*, 2010; Chameltorit *et al.*, 2016), por lo que es necesario realizar pruebas que permitan conocer el posible antagonismo, sinergismo o neutralismo entre dos o más ACB.

Por su parte, las plantas cuentan con un sistema inmune complejo constituido por defensas preformadas e inducidas. El sistema de defensa inducido es mediado por una serie de receptores que reconocen el estímulo biótico e inducen la síntesis *de novo* de proteínas y compuestos antimicrobianos, producto de la expresión de los genes de defensa (Monaghan *et al.*, 2009). La resistencia a *P. capsici* en variedades y líneas de chile, se asocia con la expresión de genes codificantes para proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) como PR1, PR2-glucanasas (GLU), PR3-quitinasas (CHI) y PR9-peroxidasas (POX) (Castro-Rocha *et al.*, 2012); de genes involucrados en la síntesis de compuestos antimicrobianos como el gen *EAS* (5 epi-aristoloqueno sintasa), clave para la biosíntesis de capsidiol, la principal fitoalexina presente en chile (Zavala-Paramo *et al.*, 2000); y de los factores de transcripción *WRKY-a* y *WRKYI* que actúan como reguladores activando o suprimiendo la expresión de estos genes bajo diversas interacciones de la planta con el medio (Rushton *et al.*, 2010).

La presencia de ACB en la rizósfera de variedades comerciales de chile, activa la expresión temprana de los genes de defensa, incrementando la capacidad de defensa de la planta y disminuyendo los efectos adversos causados por fitopatógenos (Annapurna *et al.*, 2013; Prashar *et al.*, 2013). La cepa KJA-424 de *Paenibacillus illinoisensis* incrementó de forma sistémica el contenido y actividad enzimática de proteínas

relacionadas con el proceso de lignificación como PAL (fenilalanina amonio liasa), PPO (polifenol oxidasa) y POX, tales cambios se correlacionaron con la disminución en la mortalidad de raíces en presencia de *P. capsici* (Jung *et al.*, 2004). También incrementó de manera sistémica el contenido y actividad de enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular de fitopatógenos como GLU, CHI y celulasas (Jung *et al.*, 2005). Especies de *Trichoderma* como *T. ovalisporum*, *T. hamatum*, *T. theobromicola*, *T. stilbohypoxy* y *T. carbbaeum* indujeron un incremento en la acumulación de transcritos de los genes *SC* (sesquiterpeno ciclasa) y *EAS* implicados en la biosíntesis de capsidiol en plantas de pimiento variedad Bugang (Bae *et al.*, 2011).

Con base en estos antecedentes, en la presente investigación se probó la capacidad de diversos ACB para aminorar el impacto de *P. capsici* sobre el cultivo de chile Jalapeño, teniendo como objetivos:

- 1) Evaluar la capacidad antagónica de 10 aislamientos bacterianos: B3, C6, E4, E11, P3, S5 (no identificados); *Bacillus pumilus* R44; *Pseudomonas tolaasii* A46 y P61; y *P. putida* S4. 10 hongos: *Trichoderma virens* T01, T022, T037 y T046; *T. koningii* T023 y T03; *T. harzianum* T038; *T. viride* T056 y TGC; *T. atroviride* T0X; y un hongo micorrízico (*Rhizophagus intraradices*) contra *P. capsici* y otros fitopatógenos asociados a la marchitez; y su efecto en el crecimiento de chile Jalapeño.
- 2) Determinar *in vitro* la compatibilidad entre ACB.
- 3) Evaluar la capacidad protectora de los consorcios de ACB compatibles contra *P. capsici* en chile Jalapeño
- 4) Evaluar los niveles de transcritos de los genes *WRKY-a*, *WRKY1*, *PRI*, *GLU*, *CHI*, *POX* y *EAS* en plantas de chile Jalapeño inoculadas con un consorcio de ACB.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos antagonistas, fitopatógenos y preparación de inóculo

En total se probaron 10 aislamientos bacterianos, 10 fúngicos y uno fúngico micorrízico. Las cepas bacterianas B3, C6, E4, E11, P3, S5 (no identificados) y S4 (*P. putida*) se aislaron del cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdarifa*) en el estado de Guerrero; México; estas cepas mostraron antagonismo *in vitro* contra *Phytophthora parasitica* (Meléndez-Monroy *et al.*, 2016) y fueron proporcionadas por el Dr. Sergio Aranda Ocampo del Departamento de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo (COLPOS). Las cepas bacterianas A46 (*P. tolaasii*) aislada de raíces de chile (*C. annuum* L.), P61 (*P. tolaasii*), R44 (*B. pumilus*) aisladas de rizosfera de papa (*Solanum tuberosum* L.); las especies de Trichoderma: T01, T022, T037, T046 (*T. virens*), T023, T03 (*T. koningii*), T038 (*T. harzianum*), T056, TGC (*T. viride*) y T0X (*T. atroviride*) mostraron ser antagonistas *in vitro* contra *Sclerotinia sclerotiorum* y *S. minor* (Ibarra-Medina *et al.*, 2010), y un aislamiento micorrízico Rin (*R. intraradices*) fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro Alarcón del Departamento de Microbiología del Postgrado de Edafología del COLPOS.

El inóculo bacteriano para los bioensayos de antagonismo *in vitro* se realizó a partir de colonias bacterianas puras con 48 h de crecimiento en PDA a 28±2°C. Para los bioensayos en planta se prepararon suspensiones celulares en agua destilada estéril (ADE), el número de ufc mL<sup>-1</sup> se determinó mediante espectrofotometría de luz visible (densidad óptica de 0.45 y longitud de onda de 610 nm), cada planta se inoculó con 3x10<sup>8</sup> ufc por planta (Muthukumar *et al.*, 2011).

Para los ACB fúngicos se utilizaron discos de 5 mm de diámetro con micelio en los bioensayos *in vitro*. Para los bioensayos en planta se vertió ADE sobre la colonia fúngica y se raspó la superficie para desprender los conidios. La suspensión se filtró

mediante una gasa estéril, el número de conidios  $\text{mL}^{-1}$  se determinó mediante un hemacitometro, las plantas se inocularon con  $1 \times 10^7$  conidios por planta (Chowdappa *et al.*, 2013). En el caso del aislamiento micorrízico se utilizó arena de río con 8 propágulos  $\text{g}^{-1}$  de arena sustituyendo el 25% del sustrato en el bioensayo.

La cepa 6143 de *P. capsici* fue proporcionada por la Dra. Silvia Fernández-Pavía del Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, en Morelia Michoacán. La cepa se sembró en cajas Petri de (100 mm diámetro) conteniendo V8-Agar a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  en oscuridad, una vez que el micelio cubrió la superficie del medio de cultivo, se fragmentó y se aplicó solución isotónica de NaCl al 0.9% (Abbott®) (suficiente para cubrir el micelio) por 5 min; después, los fragmentos se transfirieron a una caja Petri de 150 mm de diámetro, se cubrieron con ADE y se mantuvieron a temperatura ambiente bajo luz fluorescente durante 48 h y en oscuridad por 24 h a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para la liberación de zoosporas, las cajas se sometieron a temperatura de  $-20^\circ\text{C}$  durante 10 min y posteriormente 15 min a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se cuantificó el número de zoosporas por mililitro de agua y la densidad se ajustó a  $1 \times 10^5$  zoosporas  $\text{mL}^{-1}$ . Las cepas *P. ultimum*, *F. oxysporum*, fueron proporcionadas por la M.C. Victoria Ayala Escobar y *R. solani* por la Dra. Ma. Del Pilar Rodríguez Guzmán del departamento de Fitosanidad del COLPOS. Los cuatro fitopatógenos fueron aislados de plantas de chile con síntomas de marchitez.

## **Antagonismo y promoción de crecimiento vegetal**

### ***Antagonismo in vitro***

Para el antagonismo de los ACB bacterianos, se confrontaron los diferentes ACB contra *P. capsici*, *P. ultimum*, *F. oxysporum* y *R. solani* en cultivos duales sobre medio PDA. Los oomicetos y hongos se inocularon en el centro de la caja mediante un disco de 5 mm de medio con micelio del fitopatógeno; los ACB bacterianos se inocularon

estriando masa bacteriana en cuatro puntos equidistantes del centro en el margen exterior del medio contenido en la caja Petri. Como control se inoculó el patógeno y ACB por separado. El experimento se incubó a  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$ . Se registró el diámetro de crecimiento del fitopatógeno y se calculó el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento con la fórmula (Gou *et al.* 2006):

$$\text{PIC}=[(\text{CDC}-\text{CDA})\cdot 100]/\text{CDC}$$

En donde:

CDC= Crecimiento Diametral del Control (fitopatógeno)

CDA= Crecimiento Diametral del fitopatógeno en presencia del ACB

Para el antagonismo de los ACB fúngicos, primero se colocó un disco de 5 mm con micelio de cada fitopatógeno en medio PDA con los siguientes periodos de incubación y crecimiento: *P. capsici*: 48 h, *P. ultimum*: 24 h, *R. solani*: 0 h y *F. oxysporum* 168 h. Posterior a este periodo, se colocó un disco de 5 mm con micelio del ACB a una distancia de 69 mm del fitopatógeno. Los controles constaron de fitopatógeno y ACB por separado. Las cajas se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$ . Se registró el avance del micelio del ACB sobre el micelio del fitopatógeno y se determinó el porcentaje de Colonización utilizando la siguiente fórmula (Ibarra-Medina *et al.*, 2010):

$$\text{C}=(\text{DCA}/\text{DAF})\cdot 100$$

En donde:

DCA= Distancia Colonizada por el ACB

DAF= Distancia entre el ACB y el Fitopatógeno.

Adicionalmente, para los ACB fúngicos se determinó la eficiencia del micoparasitismo. Se tomaron discos de 5 mm de diámetro del área en donde se encontraron ambos micelios y se sembraron en cajas Petri con medio V8-agar (*P. capsici* y *P. ultimum*), y en PDA (*F. oxysporum* y *R. solani*) y se incubaron a 28°C±2°. Como parámetros de comparación se sembraron discos de micelio de los controles. Bajo un estereoscopio se observó el desarrollo y crecimiento del ACB o del fitopatógeno según el caso, se consideró una escala arbitraria de cuatro niveles mediante la cual se asignó la eficiencia micoparasítica a cada ACB fúngico (Cuadro 2.1). Cada tratamiento constó de 4 repeticiones, los experimentos se repitieron dos veces.

**Cuadro 2.1** Escala de evaluación de eficiencia parasítica para agentes de control biológico fúngicos.

Rango	Asignación	Observaciones
3	Altamente efectivo	Se observó solamente micelio del ACB siendo capaz de producir conidios al mismo tiempo y de forma similar al control.
2	Medianamente efectivo	Se observó micelio del ACB, éste demoró en crecer y desarrollarse en comparación al control. En algunos casos no hubo presencia de conidios y en otros se observó un cambio en la coloración y forma típica de éstos. No se observó presencia del fitopatógeno.
1	Poco efectivo	Se observó crecimiento de micelio del fitopatógeno entre el micelio del ACB. Ninguno de los dos se desarrolló de forma similar a sus respectivos controles.
0	No efectivo	Se observó crecimiento del fitopatógeno, en algunos casos el crecimiento y desarrollo no fue similar al control, sin embargo, en ningún caso hubo presencia del ACB.

### ***Promoción de crecimiento de chile jalapeño***

Para los bioensayos con plantas, semillas de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) var. M marca Caloro® se lavaron con detergente líquido, se sumergieron 5 min en solución de NaCl al 3%, 1 min en etanol al 70% y se enjuagaron con ADE. Se embebieron durante 12 h en agua estéril y se germinaron en cámaras húmedas a una temperatura de  $28\pm 1^\circ\text{C}$  en la oscuridad. Las plántulas se pasaron a suelo proveniente de una parcela del campo experimental del Campus Montecillo del COLPOS previamente esterilizado por 60 min a  $120\pm 1^\circ\text{C}$  y 20 lb de presión por tres ocasiones. Sus características físicas y químicas fueron: textura migajón-limoso (22% arcillas, 10% arenas, 68% limos), pH 7.5, 2.4% de materia orgánica, 0.2% de nitrógeno total,  $104\text{ mg kg}^{-1}$  de amonio,  $104\text{ mg kg}^{-1}$  de nitratos,  $0.3\text{ mg kg}^{-1}$  de fósforo,  $0.013\text{ mg kg}^{-1}$  de potasio soluble,  $2.75\text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{Ca}^{++}$  soluble,  $3.25\text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{Mg}^{++}$  soluble,  $0.03\text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{Na}^{++}$  soluble,  $0.73\text{ mg kg}^{-1}$  de sulfatos,  $110.15\text{ cmol}(+)\text{ kg}^{-1}$  de capacidad de intercambio catiónico y  $0.82\text{ dSm}^{-1}$  de conductividad eléctrica

Las plántulas se transfirieron a macetas de plástico conteniendo 40 g de suelo de campo estéril. Cada una se inoculó por única vez al momento del trasplante con un mL de suspensión de células bacterianas ( $3\times 10^8\text{ ufc mL}^{-1}$ ), 1 mL de suspensión de conidios ( $10^7\text{ conidios mL}^{-1}$ ) o con micorriza (sustituyendo el 25% del peso del suelo por arena de río con 8 propágulos  $\text{gr}^{-1}$  de arena del hongo micorrízico arbuscular) de acuerdo al tratamiento. A los testigos solamente se les aplicó ADE. El experimento se mantuvo a  $26^\circ\text{C}\pm 2^\circ$ , con fotoperiodos de 14 h de luz fluorescente a una intensidad de 6,786 lux y 10 h de oscuridad. Las plantas fueron regadas cada 48 h con agua corriente estéril (ACE). A los 30 días las plantas se retiraron del suelo y fueron puestas a secar para posteriormente evaluar la biomasa acumulada expresada como peso seco. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones, el experimento se repitió una vez.

## Actividad fisiológica y compatibilidad entre ACB

### *Bioensayos de actividad fisiológica*

La detección de algunas características fisiológicas que pudieran estar relacionadas con el control biológico se hizo en medios selectivos e indicadores. En el cuadro 2.2 se muestran los medios utilizados. Los ACB se colocaron en el centro de las cajas para cada medio y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$ . Se midieron los halos indicativos de la actividad fisiológica evaluada mediante un vernier digital Trupper®. Cada tratamiento constó de tres repeticiones, el experimento se repitió una vez.

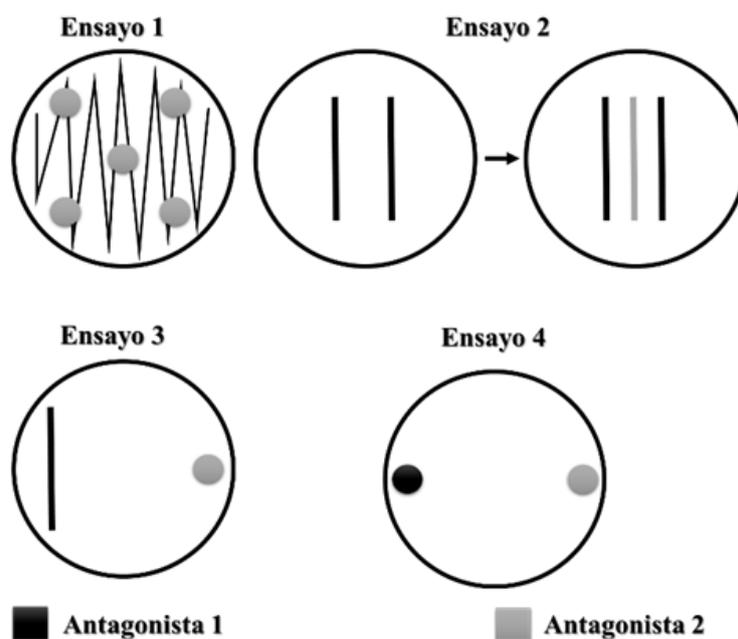
**Cuadro 2.2.** Pruebas de actividad fisiológica.

Medio	Act. Fisiológica	Enzima	Positivo	Referencia
Rennie	Fijación de N	Nitrogenasa	Crecimiento (Selectivo)	Wollum, 1982
Pikovskaya	Solub. Fosfatos	Prod. Ac. orgánicos	Halo transparente	
Caldo Luria-Bertani con triptófano	Prod. Índoles	Triptofanasa	Coloración rosada	Frey-Klett <i>et al.</i> , 2005
Gelatina-Peptona	Proteólisis	Diversas proteasas	Licuefacción	Hantsis-Zacharov y Halperin, 2007
Tween 80-Agar	Lipolisis	Lipasas y Esterasas	Halo de cristales	
Carboximetilcelulosa	Celulólisis	Endoglucanasas $\beta$ -1,4	Halo amarillo	Suyama <i>et al.</i> 1993
Malta-Ac. Tánico	Oxidación	Polifenoloxidasas	Halo oscuro	Subba Rao, 1992
CAS	Quelación de hierro	Sideróforos	Halo amarillo o naranja	Louden <i>et al.</i> , 2011
MM9-quitina coloidal-Agar	Hidrolisis quitina	Quitinasas	Halo transparente	Atlas, 2005

### *Bioensayos de compatibilidad entre ACB*

Mediante confrontaciones en cultivos duales se evaluó la compatibilidad entre los diferentes ACB utilizados. La interacción se consideró compatible cuando ambos ACB confrontados crecieron y se desarrollaron en el medio, incompatible si el crecimiento y

desarrollo de alguno de ellos era afectado, y fungistática o bacteriostática si uno de los ACB reducía la velocidad de crecimiento sin afectar el desarrollo del otro. En la Figura 2.1 se esquematizan los ensayos de confrontación para determinar la compatibilidad entre los ACB. En los testigos cada ACB se sembró por separado. Las cajas se mantuvieron a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ .



**Fig. 2.1. Bioensayos de confrontación entre ACB. Ensayos:** 1) **Pruebas de siembra simultánea:** El antagonista 1 se dispersó en el medio a partir de  $50\ \mu\text{L}^{-1}$  de suspensión conteniendo propágulos ( $3 \times 10^8\ \text{cel mL}^{-1}$  o  $10^7\ \text{conidios mL}^{-1}$ ) y el antagonista 2 se colocó por medio de una asada de masa bacteriana por punto o por discos de medio con micelio. 2) **Prueba de confrontación entre bacterias:** Ambos antagonistas fueron bacterianos, se realizó sembrando los ACB de forma simultánea y desfasada en donde el antagonista 1 se sembró con 48 h de ventaja con respecto al antagonista 2. 3) **Prueba de confrontación entre bacteria y hongo:** La siembra fue simultánea colocando un ACB frente al otro. 4) **Prueba de confrontación entre hongos:** La siembra fue simultánea y al término del ensayo se tomó un disco con micelio de la zona donde se encontraron los dos aislamientos, se transfirió a una caja con PDA para comparar su crecimiento.

### Bioensayos de control biológico en condiciones de invernadero

Los ACB para el bioensayo se seleccionaron considerando su grado de antagonismo contra los cuatro fitopatógenos y su capacidad de promoción de crecimiento; los tratamientos se conformaron tomando en cuenta los resultados de las pruebas de

compatibilidad (Cuadro 2.3). Las plántulas para estos bioensayos se obtuvieron de la manera descrita con anterioridad. La unidad experimental constó de una charola de plástico (28 cm largo, 18 cm ancho, 16 cm alto) conteniendo suelo natural estéril con 40 plantas. Las plantas se inocularon con ACB por tres ocasiones, una al momento del trasplante, la segunda aplicación al transcurrir los 20 días después del trasplante, y la tercera un día antes de inocular al patógeno, la cual se realizó cuando las plantas tuvieron de 4 a 6 hojas verdaderas (45 días después del trasplante). En cada inoculación se consideraron  $3 \times 10^8$  ufc por planta para los ACB bacterianos,  $1 \times 10^7$  conidios por planta en caso de los ACB fúngicos y para el fitopatógeno  $1 \times 10^5$  zoosporas por planta, los cuales fueron suspendidos y aplicados en el agua de riego. Las plantas se regaron cada 48 h con agua estéril y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero. El experimento se detuvo al registrar plantas muertas (15 días posteriores a la inoculación con el fitopatógeno). Se registró la incidencia (porcentaje de plantas enfermas y muertas por tratamiento), y el área total de la raíz y la severidad (porcentaje de área necrosada en raíz y cuello) se determinaron mediante el procesamiento de imágenes usando el software de libre acceso IMAGEJ (Schneider *et al.*, 2012). Se registró la biomasa (mg de peso seco) de la planta completa. Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones y el experimento se repitió una vez.

**Cuadro 2.3.** Tratamientos establecidos en el bioensayo de protección en condiciones de invernadero.

<b>Tratamiento</b>	<b>Microorganismos</b>
Pp+Pt	<i>Pseudomonas putida</i> S4 / <i>Pseudomonas tolaasii</i> A46
Pt+Ta	<i>P. tolaasii</i> A46 / <i>Trichoderma atroviride</i> T0X
Tv	<i>Trichoderma viride</i> T01
Pp+Pt+Ta+Tv	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. atroviride</i> T0X / <i>T. virens</i> T01
CA	Control Absoluto (agua estéril)
Pc	<i>Phytophthora capsici</i>
Pp+Pt+Pc	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46 / <i>P. capsici</i>
Pt+Ta+Pc	<i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. atroviride</i> T0X / <i>P. capsici</i>
Tv+Pc	<i>T. viride</i> T01 / <i>P. capsici</i>
Pp+Pt+Ta+Tv+Pc	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. atroviride</i> T0X / <i>T. virens</i> T01 / <i>P. capsici</i>

### **Expresión de genes de defensa en plantas de chile jalapeño**

#### *Establecimiento del bioensayo*

Plántulas obtenidas como se mencionó anteriormente se trasladaron a charolas de plástico (28 cm largo, 18 cm ancho, 16 cm alto) conteniendo suelo estéril y se regaron cada 48 h con agua estéril, en el quinto riego (11 días), el agua estéril fue sustituida por una solución nutritiva (dilución 1:10 de Nitrofoska: Agua). Durante el transcurso del experimento se observó la presencia y daño en algunas plantas de gusano falso medidor de la col [*Trichoplusia* sp. (Lepidoptera: Noctuidae)], por lo que se aplicó 5mL de cipermetrina L<sup>-1</sup> [Siroco 20 EC (Tridente ®)], de igual manera se observó la presencia de pulgón del algodón [Aphis gossypii (Homoptera: Aphididae)], el cual se controló con una emulsión de jabón potásico, aceite vegetal de girasol y canola, y agua (400 g, 1 L y 10 L, respectivamente), ambos se asperjaron a punto de rocío. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 35 días posteriores a su trasplante y al cabo de los

cuales se transfirieron a una cámara bioclimática a temperatura de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con fotoperiodos de 14 h de luz fluorescente (intensidad luminosa de 6768 lux) y 10 h oscuridad. Diez días después de haber sido transferidas, las plantas se inocularon con *P. putida* S4 y *P. tolaasii* A46 ( $3\times 10^8$  ufc  $\text{ml}^{-1}$  por planta; Pp+Pt) ya que con éste tratamiento se obtuvieron los mejores resultados en los bioensayos de control biológico en condiciones de invernadero. El tratamiento testigo consistió en plantas no inoculadas. Cada tratamiento constó de cuatro charolas con 40 plantas cada una. A las 6, 12, 24, 72 y 168 h posteriores a la inoculación (hpi) se tomaron las raíces de 30 plantas por cada charola de cada tratamiento para estimar los niveles de expresión de los genes asociados con defensa. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas. El experimento se repitió una vez.

#### ***Extracción de RNA total y síntesis de cDNA***

Se extrajo el RNA total utilizando el RNeasy® Plant mini kit de Qiagen, seguido de una digestión con DNasa (Quiagen) de acuerdo al protocolo del fabricante. La pureza e integridad del RNA se verificó por espectrofotometría (ND-1000®, Nanodrop Technologies) y por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%, respectivamente. Se sintetizó cDNA mediante una retrotranscripción de dos pasos. Reacción 1: 2µg de RNA total se mezclaron con 0.5 µL de oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen) aforando a 12 µL con agua libre de nucleasas (Gibco® de Invitrogen), la mezcla se incubó a 65°C por 10 min; reacción 2: a la reacción 1 se adicionaron 6 µL de buffer 5x para retrotranscripción, 1 µL de dNTP mix (10 mM) y 1 µL de retrotranscriptasa M-MLV (Promega). La mezcla resultante se incubó en un termociclador (TC-3000 Techne) durante 1 h a 37°C y 10 min a 70°C. El cDNA generado fue utilizado para medir los niveles de expresión génica relativa mediante PCR en tiempo real.

### ***PCR en tiempo real***

Los primers utilizados en el presente estudio aparecen en el Cuadro 2.4. Los correspondientes al gen *CHI* fueron diseñados en este estudio mediante el software de libre acceso Primer 3 (Untergasser *et al.*, 2012) a partir de la secuencia con número de accesión AF091235 disponible en el GenBank del NCBI. Para los genes *GAPDH*, *EAS*, *GLU*, *PRI*, *POX*, *WRKY-a* y *WRKYI* la mezcla de reacción consistió de 1.1  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 10X, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.3  $\mu\text{L}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) (Invitrogen), 0.2  $\mu\text{L}$  de amplificasa Platinum™ (Invitrogen), 0.1  $\mu\text{L}$  de SYBR GREEN 100X como fluoróforo y 2  $\mu\text{L}$  de cDNA 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , aforando a un volumen de 11  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas (Gibco® de Invitrogen), para el gen *CHI* se ajustó la concentración final de  $\text{MgCl}_2$  a 2.5 mM. La mezcla resultante se incubó en un sistema de PCR-tiempo real CFX96™ de Biorad, las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C / 4 min, seguida de 30 ciclos a 94°C / 30s, un alineamiento a 60°C / 30s (55°C para *WRKY-a*) y una extensión a 72°C / 30s, los datos se colectaron durante el paso de extensión. Adicionalmente se incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos y se corroboró mediante electroforesis y secuenciación de los productos de PCR. Se calculó la expresión génica relativa mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Schmittgen y Livak, 2008). Para normalizar la expresión se usó el gen de expresión constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Los niveles de expresión relativa de genes se calibraron mediante las plantas testigo (sin antagonista), las cuales se consideraron como la expresión 1X. Los niveles de transcritos del gen de interés se expresaron en número de “veces” en respuesta a la interacción con los ACB y en relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo. Las determinaciones se realizaron a partir de cDNA

**Cuadro 2.4.** Primers usados para determinar la acumulación relativa de transcritos de genes relacionados con la defensa en plantas de chile jalapeño inoculado con ACB de *Phytophthora capsici*.

Gen	Proteína	Relacionado con	Secuencia (5'-3')	Amplicón	<sup>n</sup> Accesión
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Implicado en la glucólisis (gen constitutivo)	<sup>φ</sup> Fw GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC Rv GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217pb	AJ246011
<i>CHI</i>	PR-3 Quitinasa básica tipo II	Hidrólisis de quitina y glicoproteínas, actividad muramidasa	<sup>ψ</sup> Fw CAGGGACTTGTTTGAACGG Rv GCTGACCTATCTGCTGGTG	483pb	AF091235
<i>EAS</i>	5-epi-aristoloqueno sintasa	Clave en la síntesis de la fitoalexina sesquiterpenica capsidiol	<sup>φ</sup> Fw GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG Rv TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	200pb	AJ005588
<i>GLU</i>	PR-2 β-1,3-glucanasa básica	Hidrolisis de β-glucanas en pared celular	<sup>φ</sup> Fw GAGGCTCCAACATTGAAGTTATG Rv CATCTTGTACCACCACATTAGGTGC	480pb	AF227953
<i>POX</i>	PR-9 Peroxidasa	Participa en respuesta de hipersensibilidad y en lignificación	<sup>φ</sup> Fw CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG Rv GGATGCGTCGATTGAAGGGTC	560pb	AF442386
<i>PR-1</i>	PR-1 Proteína relacionada patogénesis	Marcador molecular que indica la activación de respuestas de defensa	<sup>τ</sup> Fw GTTGTGCTAGGGTTCCGGTG Rv CAAGCAATTATTAAACGATCCA	301pb	AF053343
<i>WRKY1</i>	Factor de transcripción	Regulador de expresión de genes de defensa ante algún estímulo	<sup>φ</sup> Fw CAGCAGCAAGAGGAAAGAAGT Rv GGCAGTAGAACCCCTGATTTAGC	335pb	EF468464
<i>WRKY-a</i>	Factor de transcripción	Regulador de expresión de defensa ante algún estímulo	<sup>φ</sup> Fw CATTACCGTCAACCATCTCA Rv TCAACATCCTCATCTCCAAA	377pb	AY391747

<sup>n</sup>NCBI (National Center for Biotechnology Information); <sup>φ</sup>Primers diseñados por nuestro equipo de trabajo; <sup>ψ</sup>Primers diseñados en el presente estudio; <sup>τ</sup>Gayoso *et al.*, 2007

obtenido de dos experimentos realizándose ocho determinaciones para cada tratamiento por tiempo evaluado.

### **Procesamiento y análisis estadístico de los datos**

#### ***Análisis estadístico de los datos provenientes de los bioensayos in vitro y en planta, y de PCR en tiempo real***

Los datos de las variables evaluadas se sometieron a comprobación de los supuestos de homogeneidad de varianzas y distribución normal de los errores. Una vez cumplidos dichos supuestos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de separación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Los datos del área de la raíz, se sometieron a una transformación logarítmica con base 10. Los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS 9.1 para Windows. Con la finalidad de conocer el comportamiento de los genes a través del tiempo, el análisis estadístico se hizo para cada gen comparando la expresión registrada en los diferentes tiempos. En los diferentes bioensayos, para llevar a cabo los análisis estadísticos de cada variable evaluada se conjuntaron todos los datos de los experimentos realizados.

### **Caracterización polifásica e identificación de la cepa S4**

#### ***Caracterización morfológica de la colonia***

Se inoculó masa bacteriana de 24 h de crecimiento en tres puntos equidistantes sobre cajas Petri con los medios de cultivo: agua-agar, agar nutritivo, B de King, PDA, extracto de malta-agar, harina de maíz-agar, jugo V8-agar y R2-agar, y se incubaron a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por seis días. Posteriormente, la morfología de la colonia se observó mediante un microscopio estereoscópico Discovery.V20® de Zeiss acoplado a una cámara, se midieron con un Vernier digital Truper® y se observó bajo luz ultra violeta (366 nm longitud de onda) para verificar la producción de pigmentos fluorescentes.

### ***Caracterización bioquímica***

La caracterización bioquímica se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal. Se utilizó el sistema de identificación-caracterización basado en pruebas bioquímicas miniatura estandarizadas GEN III MICROPLATE de Biolog® siguiendo las indicaciones del fabricante. Los datos obtenidos de la lectura de las pruebas fueron capturados en el sistema Omnilog® de la misma compañía para la determinación del género bacteriano y la posible especie. Las pruebas se repitieron tres veces.

### ***Caracterización molecular***

*Extracción de DNA bacteriano.* Se utilizó el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones. A partir de un cultivo bacteriano puro de 24 h de crecimiento se preparó una suspensión saturada de células bacterianas en 250 µL de agua estéril, se añadió 1 mL<sup>-1</sup> de CTAB, se agitó con vórtex y se incubó a 65°C por 10 min. Se añadieron 500 µL de cloroformo (absoluto) frío, se agitó vigorosamente por 10 min y se centrifugó a 13 mil rpm por 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se añadió isopropanol (70%) frío, se mezcló por inmersión y se centrifugó por 10 min a 13 mil rpm. Se decantó el líquido y la pastilla se lavó con etanol (70%) frío para después centrifugar por 5 min a 13 mil rpm. Se decantó nuevamente el sobrenadante y la pastilla se secó durante 1 h. La pastilla se resuspendió en 50 µL de agua y se cuantificó utilizando un Nanodrop®. La calidad del DNA se corroboró por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

*Primers para la amplificación de los genes 16 s, gyr B, rpo B y rpo D.* Los genes amplificados para el análisis de secuencias multilocus (MLSA, por sus siglas en inglés) se seleccionaron de acuerdo a los recientes análisis filogenéticos y sistemáticos del género

*Pseudomonas* (Gomila *et al.*, 2015). Los primers utilizados para la amplificación de los genes *16s*, *gyr B*, *rpo B* y *rpo D* se indican en el Cuadro 2.5.

*Condiciones de amplificación y secuenciación de los genes para la identificación de la cepa S4.* La mezcla de las reacciones para amplificar los genes *16s*, *gyrB* y *rpoD* constó de: 1) Buffer 1X, 2) 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3) 0.2 mM dNTP's, 4) 0.4 pmol μL<sup>-1</sup> Primers, 5) 0.06 u μL<sup>-1</sup> Amplificasa® (BioTecMol), 6) 4 ng μL<sup>-1</sup> DNA, aforado a un volumen final de 25 μL por tubo de reacción con agua libre de nucleasas (Invitrogen Corporation). Para la amplificación del gen *rpoB* se utilizó una concentración de 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>. Los tubos de reacción se sometieron a 35 ciclos de incubación con los siguientes tiempos y temperaturas: 1) desnaturalización 2 min a 95°C; 2) alineamiento 1 min para *16s* a 56°C, *gyrB* a 50°C, *rpoB* a 64°C, *rpoD* a 54°C; 3) extensión 1:50 min a 72°C. Por último se dio una extensión final a 72°C por 10 min. El producto de PCR se observó por electroforesis en un gel de 1.5% de agarosa. Los productos de PCR fueron extraídos de los geles de electroforesis y secuenciados por el Departamento de Biología molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal en un Genetic Analyzer® modelo 3130 de Applied Biosystems bajo condiciones normales de secuenciación.

*Edición de secuencias y construcción de bases de datos para el MLSA.* Los electroferogramas de las secuencias obtenidas se analizaron y editaron manualmente para obtener las secuencias consenso usando el programa BioEdit®. Las secuencias resultantes se compararon por medio de un Blast contra las secuencias de los mismos genes disponibles en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), en el *Pseudomonas* Genome DataBase (PGDB) (Winsor *et al.*, 2015) y en el Pseudo MLSA Database (PMD) (Bennasar *et al.*, 2010). Las secuencias de las cepas tipo con mayor

**Cuadro 2.5.** Primers utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes *16s*, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*.

Gen	Codifica para	Relacionado con	Primers						Referencia
			Nombre	Amplicón	Para	Secuencia (5'-3')	Tamaño	TM	
<i>16s rRNA</i>	Subunidad ribosomal 16s rRNA	Traducción	8F	1500	Amplificar	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	54.3	Turner <i>et al.</i> , 1991
			1492R			GGTTACCTTGTTACGACTT	19	49.4	
			515F		Secuenciar	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	19	65.2	
			907R			CCGTC AATT CMTT TTRAGTTT	20	48.6	
			1492R			GGTTACCTTGTTACGACTT	19	49.4	
<i>gyrB</i>	Región altamente conservada de la subunidad B de la proteína girasa	Libera tensión durante la replicación	UP-1E	994	Amplificar	CAGGAAACAGCTATGACCA YGSNNGNGGNAARTTYRA	37	66.6	Yamamoto <i>et al.</i> , 1998
			APrU			TGTA AAAACGACGGCCAGTGCNGGRTCYTTYTCYGRCA	38	69	
			M13R		Secuenciar	CAGGAAACAGCTATGACC	18	50.1	
			M13(-21)			TGTA AAAACGACGGCCAGT	18	54.4	
<i>rpoB</i>	Región altamente conservada de la subunidad beta de la RNA polimerasa	Transcripción	rpoB-mycOF	723	Amplificar y Secuenciar	GGCAAGGTCACCCCGAAGGG	21	65.2	Aékambi <i>et al.</i> , 2003.
			rpoB-mycOR			AGCGGCTGCTGGGTGATCATC	21	62.3	
<i>rpoD</i>	Factor sigma 70 de la RNA polimerasa	Factor de iniciación de transcripción en bacterias	70F	713	Amplificar	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT	44	70.5	Yamamoto <i>et al.</i> , 1998
			70R			ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT	44	63.2	
			70FS		Secuenciar	ACGACTGACCCGGTACGCATGTA	23	62	
			70RS			ATAGAAATAACCAGACGTAAGTT	23	49.4	

Y=C/T; R=A/G; M=C/G/A/T; N=C/G/A/T

grado de similitud fueron incorporadas a las bases de datos utilizadas para el MLSA. Adicionalmente, las bases de datos se generaron tomando en cuenta las cepas tipo reportadas en el reciente análisis filogenético y sistemático del género *Pseudomonas* (Gomila *et al.*, 2015), obteniendo las secuencias de los genes del NCBI, del PGDB y del PMD, sumando un total de 156 cepas tipo.

*Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA).* Las secuencias de los amplicones obtenidos de la cepa S4 y de las bases de datos fueron sometidas a alineamientos múltiples mediante el programa bioinformático de libre acceso Clustal Omega (Goujon *et al.*, 2010). Posteriormente, el tamaño de las secuencias fue homogenizado para cada locus de forma manual, y los cuatro locus se concatenaron con el siguiente orden: *16s*, *gyr B*, *rpo B* y *rpo D* en el programa MEZQUITE (Maddison y Maddison, 2017). La inferencia filogenética se realizó en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el algoritmo de Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) y el método Neighbour Joining, con un análisis bootstrap de 1000 réplicas. Como fuera de grupo se utilizaron las secuencias de los mismos genes de la cepa tipo *Cellvibrio japonicus* UEDA107 (secuencias depositadas en el NCBI, número de acceso: NR\_07804.1).

## RESULTADOS

### Antagonismo y promoción de crecimiento vegetal

#### *Antagonismo in vitro*

Siete de los 10 ACB bacterianos mostraron un amplio rango de acción antagónica, inhibiendo en mayor o menor grado el crecimiento de los cuatro fitopatógenos asociados a la marchitez del chile. *P. putida* S4 (Pp) y S5 (no identificada) destacaron por su capacidad antagónica, los índices de inhibición de crecimiento generalmente fueron mayores al 60% ( $P \leq 0.05$ ) para los cuatro fitopatógenos. La mayor inhibición de *P. capsici* (73%) y de *P. ultimum* (65%) se obtuvo con Pp (Figura 2.2). El aislamiento E11 (no identificado) mostró similitud estadística a Pp y S5 contra los dos oomicetos (68 y 66%, respectivamente), en tanto que P3 (no identificado) fue altamente efectivo contra los dos oomicetos (62 y 65%, respectivamente) y *F. oxysporum* (61%) (Cuadro 2.6).

Todos los ACB fúngicos mostraron buen antagonismo solo contra algunos fitopatógenos (Cuadro 2.7). El mayor porcentaje de colonización de *P. capsici* ( $P \leq 0.05$ ) se obtuvo con los aislamientos T01 (98%) y T022 (97%) (Cuadro 2.7 y Figura 2.3). Al evaluar la eficiencia micoparasítica, T01 fue altamente efectivo contra *P. capsici* y *F. oxysporum* (rango 3), y para los otros fitopatógenos fue medianamente efectivo (rango 2), en tanto que T022 fue medianamente efectivo para todos los fitopatógenos (rango 2).

**Cuadro 2.6.** Inhibición del crecimiento de micelio de cuatro fitopatógenos asociados a la marchitez del chile por ACB bacterianos.

Tratamiento		Porcentaje de Inhibición de Crecimiento <i>in vitro</i> (PIC) <sup>n</sup>							
		<i>P. capsici</i>		<i>P. ultimum</i>		<i>R. solani</i>		<i>F. oxysporum</i>	
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<b>A446</b>	39.03	D	34.67	C	39.79	C	31.00	B
<b>BNI</b>	<b>B3</b>	28.62	E	12.57	D	13.38	E	6.26	CD
<b>BNI</b>	<b>C6</b>	25.79	E	12.45	D	0.00	F	3.30	CD
<b>BNI</b>	<b>E4</b>	60.84	C	53.00	B	25.68	D	21.2	BC
<b>BNI</b>	<b>E11</b>	68.31	AB	66.32	A	43.22	BC	37.83	B
<b>BNI</b>	<b>P3</b>	62.22	BC	65.13	A	46.82	B	60.93	A
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	<b>P61</b>	12.59	F	17.57	D	0.00	F	0.00	D
<i>Bacillus pumilus</i>	<b>R44</b>	18.56	F	13.76	D	0.00	F	0.00	D
<i>Pseudomonas putida</i>	<b>S4</b>	72.69	A	65.63	A	62.97	A	67.26	A
<b>BNI</b>	<b>S5</b>	72.51	A	65.39	A	58.85	A	62.10	A
<b>Control</b>		0.00	G	0.00	E	0.00	F	0.00	CD

<sup>n</sup> Los valores representan la media de 12 repeticiones; BNI: Bacteria no identificada. En cada columna los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ )

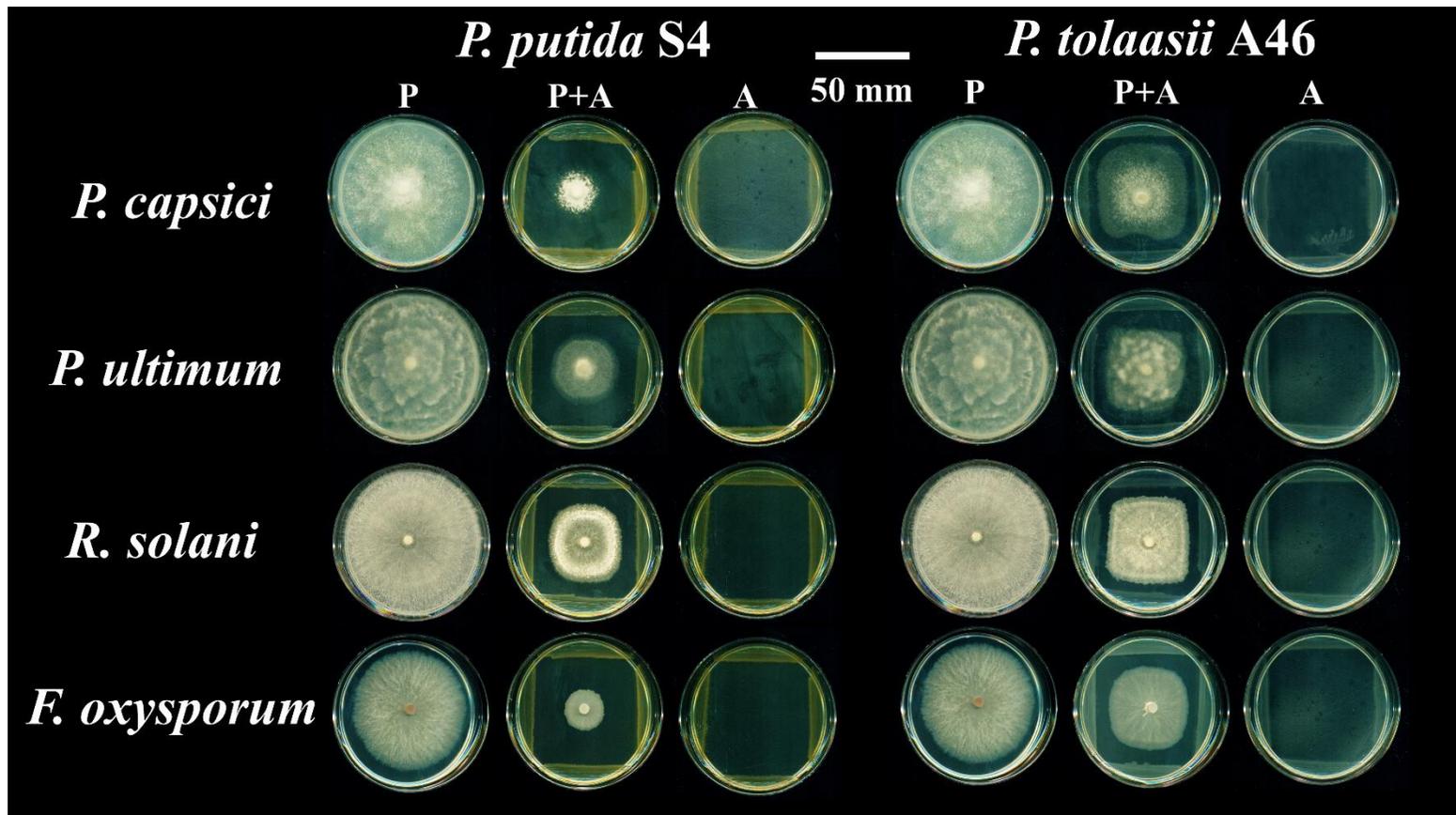
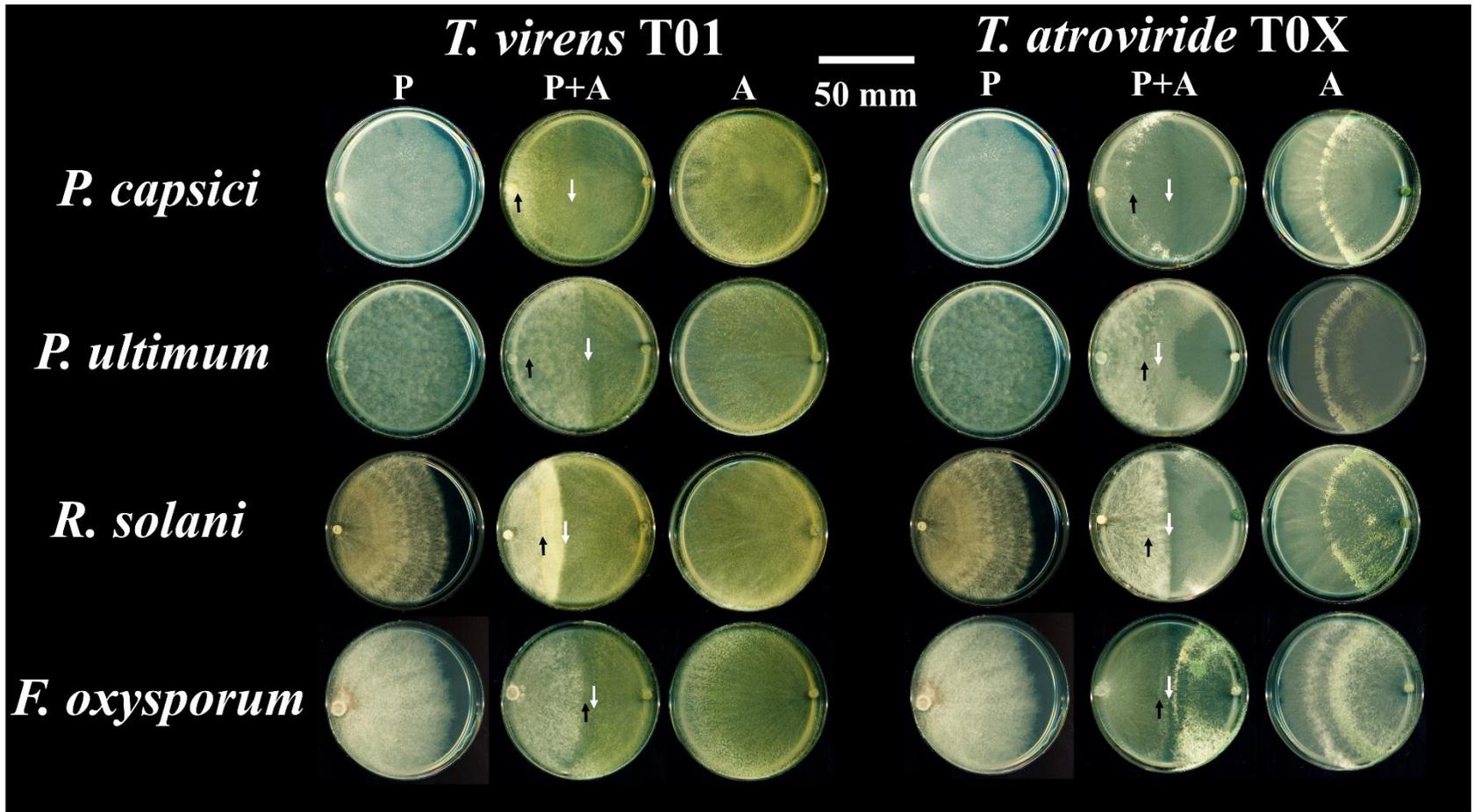


Figura 2.2. Inhibición del crecimiento micelial de cuatro fitopatógenos (P) asociados a la marchitez chile por ACB bacterianos (A). P+A: Confrontación del antagonista con el patógeno.

**Cuadro 2.7.** Colonización y eficiencia parasítica de ACB fúngicos sobre el micelio de cuatro fitopatógenos asociados la marchitez del chile.

Tratamiento	Porcentaje de Colonización <i>in vitro</i> (C) y Eficiencia Parasítica (P)											
	<i>P. capsici</i>		<i>P. ultimum</i>		<i>R. solani</i>		<i>F. oxysporum</i>					
	C <sup>π</sup>	P <sup>φ</sup>	C <sup>π</sup>	P <sup>φ</sup>	C <sup>π</sup>	P <sup>ψ</sup>	C <sup>π</sup>	P <sup>ψ</sup>				
<i>T. virens</i> T01	98.01	A	3	86.49	A	2	73.28	AB	2	49.97	CDE	3
<i>T. virens</i> T022	96.66	A	2	86.95	A	2	69.22	BC	2	48.86	CDE	2
<i>T. koningii</i> T023	62.62	D	1	76.45	B	1	80.43	A	3	46.77	CDE	3
<i>T. koningii</i> T03	91.64	ABC	2	71.10	BC	2	65.79	BCD	1	57.63	ABC	3
<i>T. virens</i> T037	60.47	D	1	66.55	CDE	1	66.42	BCD	2	64.66	AB	2
<i>T. harzianum</i> T038	61.73	D	1	69.18	CD	1	63.37	CD	1	49.58	CDE	2
<i>T. viride</i> T04	87.10	C	1	66.96	CDE	2	68.30	BCD	1	50.90	CD	2
<i>T. virens</i> T046	91.49	ABC	2	62.64	E	1	58.88	D	0	39.84	E	3
<i>T. viride</i> T056	94.87	AB	2	61.71	EF	2	60.07	BCD	1	66.76	A	3
<i>T. viride</i> TGC	87.29	BC	2	56.09	F	1	61.97	CD	1	45.95	DE	3
<i>T. atroviride</i> T0X	88.40	BC	2	64.77	DE	1	64.73	BCD	1	53.64	BC	3
Control	0	E	0	0	G	0	0	G	0	0	G	0

<sup>π</sup> Cada valor representa la media de 12 repeticiones; <sup>φ</sup> Ensayo llevado a cabo sobre medio V8-Agar; <sup>ψ</sup> Ensayo llevado a cabo sobre medio PDA; Valores de eficiencia parasítica (0) No efectivo; (1) Poco efectivo; (2) Medianamente efectivo; (3) Efectivo. En cada columna los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 2.3** Colonización del micelio de hongos fitopatógenos (P) por ACB fúngicos (A). P+A: Confrontación del antagonista con el patógeno. Las flechas negras muestran el punto máximo de colonización del ACB sobre el fitopatógeno. Las flechas blancas muestran el punto máximo de avance del fitopatógeno. Los puntos de avance se corroboraron mediante observaciones bajo el estereoscopio óptico a 40X.

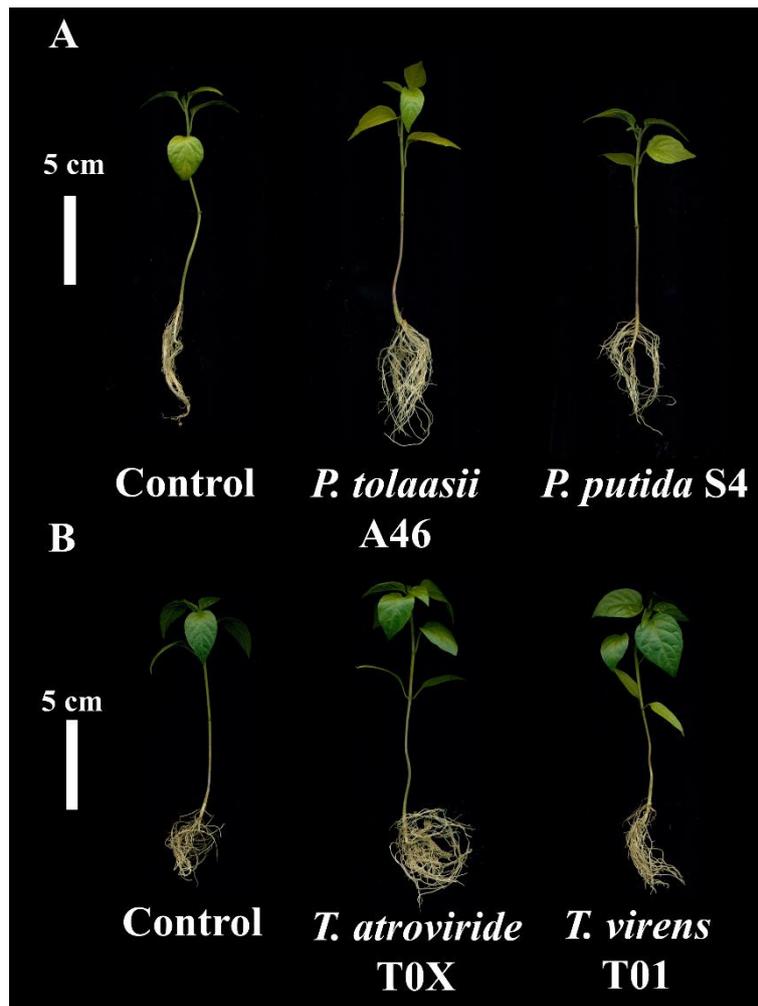
### Promoción de crecimiento vegetal

De 21 antagonistas probados, ocho promovieron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) el crecimiento de las plantas de chile Jalapeño con respecto al control (Cuadro 2.8). De los ACB bacterianos solo con *P. tolaasii* A46 se obtuvo un incremento significativo (9.4%) del peso seco (Cuadro 2.8 y Figura 2.4). De los ACB fúngicos destacó *T. atroviride* T0X con 35.6% de incremento en el peso de las plantas (Figura 2.4).

**Cuadro 2.8.** Peso seco de las plantas de chile jalapeño inoculadas con ACB bacterianos y fúngicos.

Biomasa <sup>π</sup>							
ACB Bacterianos				ACB Fúngicos			
Tratamiento		Peso seco (mg)	% <sup>ψ</sup>	Tratamiento	Peso seco (mg)	% <sup>ψ</sup>	
<i>P. tolaasii</i>	<b>A46</b>	110.84	A	9.4	<i>T. vires</i>	<b>T01</b> 70.12 ABC	11.7
<b>BNI</b>	<b>B3</b>	103.4	AB	2.1	<i>T. vires</i>	<b>T022</b> 51.46 CDE	-18
<b>BNI</b>	<b>C6</b>	96.44	ABC	-4.8	<i>T. koningii</i>	<b>T023</b> 62.6 BCD	-0.3
<b>BNI</b>	<b>E4</b>	82	CD	-19	<i>T. koningii</i>	<b>T03</b> 40 E	-36.3
<b>BNI</b>	<b>E11</b>	85.92	BCD	-15.2	<i>T. vires</i>	<b>T037</b> 58.4 BCDE	-7
<b>BNI</b>	<b>P3</b>	39.04	E	-61.5	<i>T. harzianum</i>	<b>T038</b> 63.16 BC	0.6
<i>P. tolaasii</i>	<b>P61</b>	75.26	D	-25.7	<i>T. viride</i>	<b>T04</b> 73.12 AB	16.4
<i>B. pumilus</i>	<b>R44</b>	90.96	ABCD	-10.2	<i>T. vires</i>	<b>T046</b> 63.88 BC	1.7
<i>P. putida</i>	<b>S4</b>	109.36	AB	7.9	<i>T. viride</i>	<b>T056</b> 57.06 BCDE	-9.1
<b>BNI</b>	<b>S5</b>	88.64	ABCD	-12.5	<i>T. viride</i>	<b>TGC</b> 42.88 DE	-31.7
<b>Control</b>		101.32	ABC	0	<i>T. atroviride</i>	<b>T0X</b> 85.18 A	35.6
					<i>R. intraradices</i>	<b>Rin</b> 61.76 BCD	-1.7
					<b>Control</b>	62.8 BCD	0

<sup>π</sup> Los valores representan la media de 20 repeticiones; <sup>ψ</sup> Los valores representan el porcentaje de incremento o decremento de peso con respecto al control. En cada columna los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 2.4. Efecto de los ACCB sobre el crecimiento de plantas de chile jalapeño. A:** ACCB bacterianos; **B:** ACCB fúngicos.

### Actividad fisiológica y compatibilidad entre ACCB

#### *Actividad fisiológica*

Las bacterias fueron los ACCB que con mayor frecuencia dieron reacciones positivas a las pruebas realizadas, fijaron N atmosférico, solubilizaron fosfatos y produjeron sideróforos. También mostraron actividad de enzimas proteolíticas y de lipasas-esterasas. En los hongos solo se detectó actividad de enzimas endoglucanasas y quitinasas; y en *T. atroviride* se observó además actividad de polifenoloxidasas. Todos los ACCB fueron capaces de producir índoles (Cuadro 2.9).

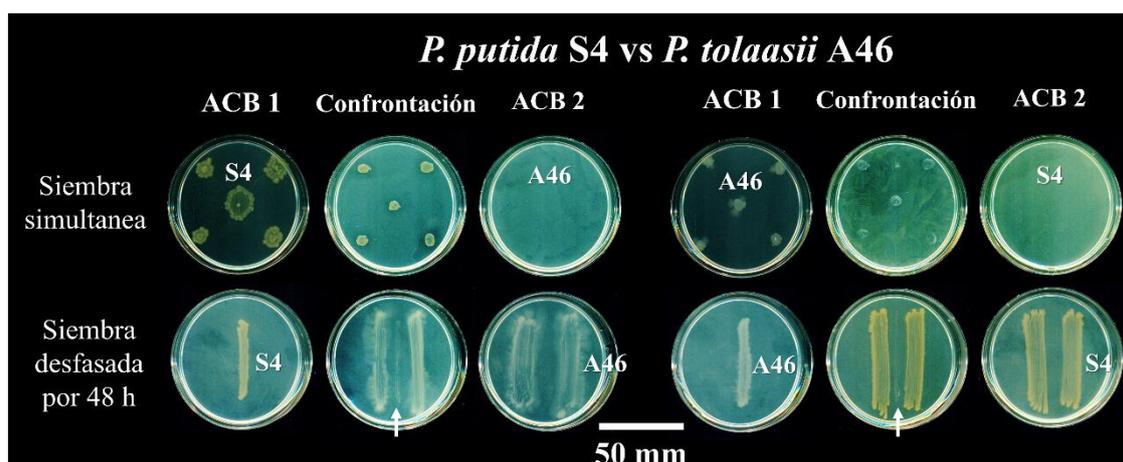
**Cuadro 2.9.** Aptitudes fisiológicas de los agentes de control biológico.

Prueba	<i>P. putida</i> S4 <sup>ψ</sup>	<i>P. tolaasii</i> A46 <sup>ψ</sup>	<i>T. virens</i> T01 <sup>ψ</sup>	<i>T. atroviride</i> T0X <sup>ψ</sup>
Fijación de N	+	+	-	-
Solub. Fosfatos	2.93 B	9.51 A	0.00 C	0.00 C
Ác. Indol Acético	+	+	+	+
Proteasas	+	+	-	-
Lipasas-Esterasas	15.22 A	7.93 B	0.00 C	0.00 C
Endoglucanasas	0.00 C	0.00 C	44.79 A	43.29 B
Polifenoloxidasa	0.00 B	0.00 B	0.00 B	22.95 A
Sideróforos	28.75 A	24.00 B	0.00 C	0.00 C
Quitinasas	0.00 C	0.00 C	44.66 A	36.44 B

+ Positivo; - Negativo. <sup>ψ</sup> Los valores representan el diámetro en milímetros de los halos generados por el cambio de color debido a la degradación del sustrato por la presencia de la enzima correspondiente, cada valor representa la media de ocho repeticiones. En cada fila los valores seguidos por la mismas letras no son significativamente diferentes (Tukey P<0.05).

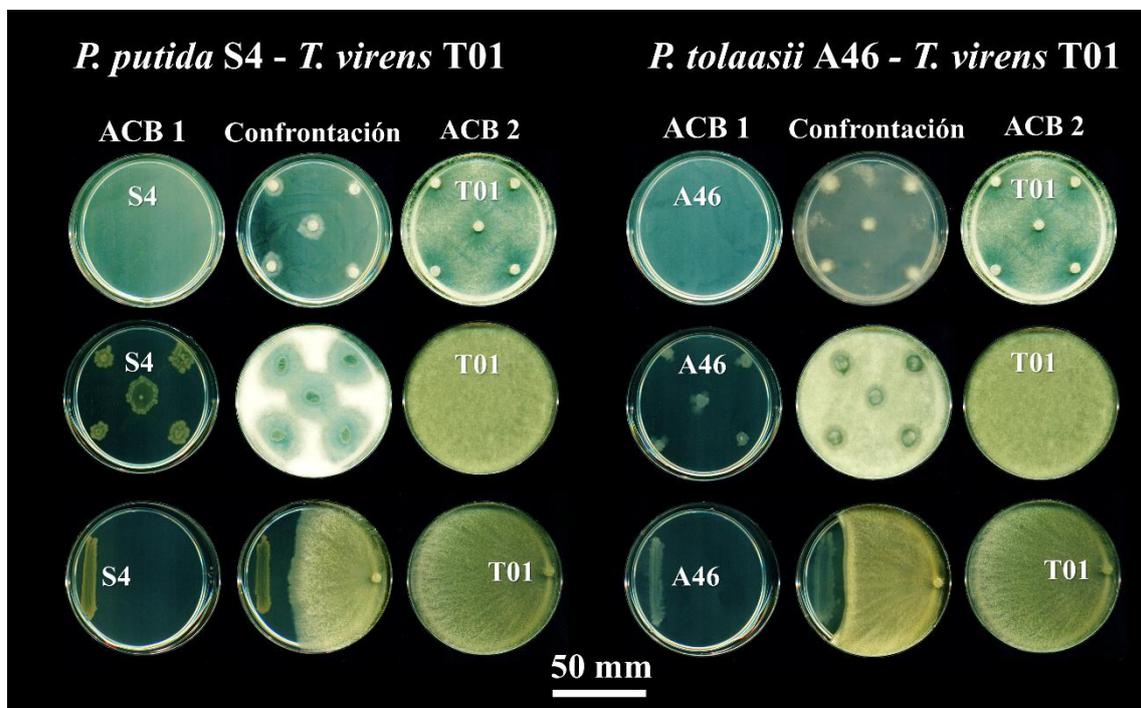
### *Compatibilidad entre ACB*

La interacción entre *P. putida* S4 y *P. tolaasii* A46 se catalogó como compatible, ya que tanto en el ensayo de siembra simultánea como en el de siembra desfasada hubo crecimiento de ambas bacterias (Figura 2.5)



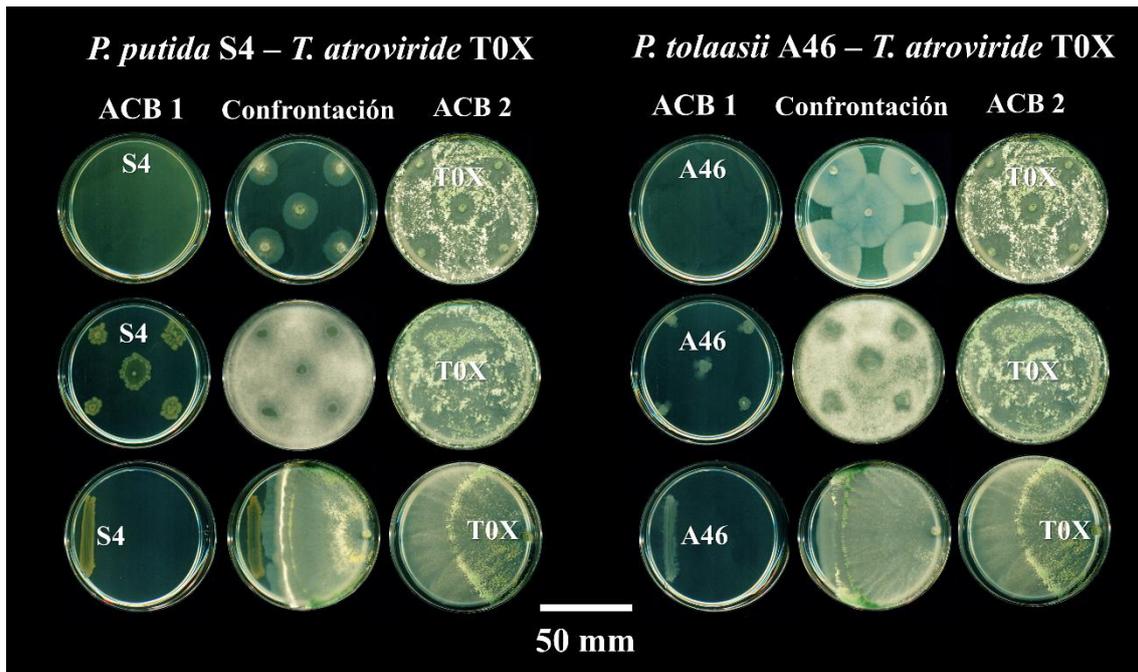
**Figura 2.5.** Interacción compatible entre los ACB bacterianos *Pseudomonas putida* S4 y *Pseudomonas tolaasii* A46. Las flechas muestran el crecimiento del ACB sembrado a las 48 h después del primero en la siembra desfasada.

La interacción entre los ACB bacterianos (*P. putida* S4 y *P. tolaasii* A46) y *T. virens* T01 fue incompatible. Ambas bacterias inhibieron el crecimiento micelial y la formación de conidios del hongo. *P. putida* S4 y *P. tolaasii* A46 inhibieron en 48% y 27% el crecimiento de *T. virens* T01, respectivamente (Figura 2.6).



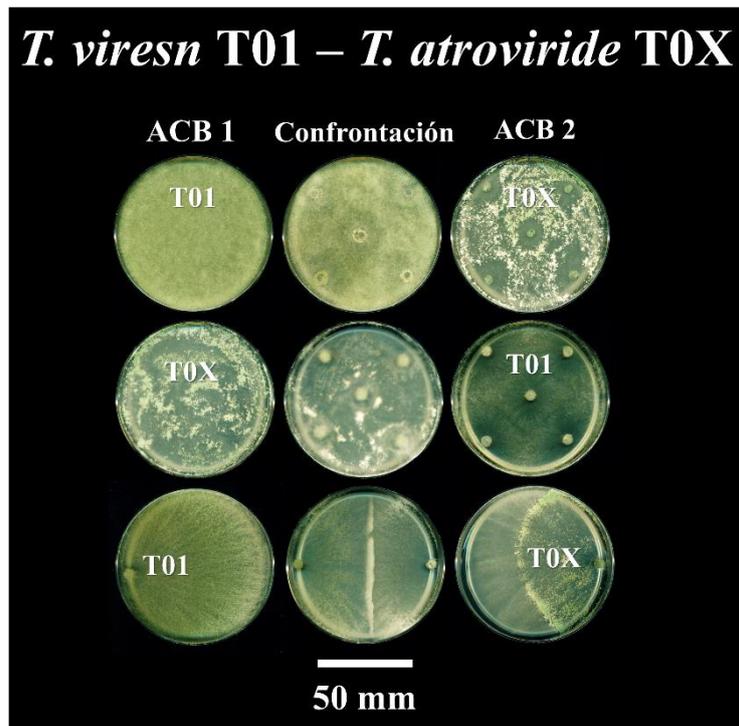
**Figura 2.6. Interacción incompatible entre los ACB bacterianos (S4 y A46) y el ACB fúngico *Trichoderma virens* T01.** En la primera hilera de cajas Petri los ACB bacterianos se dispersaron sobre la superficie y en seguida se colocaron discos de crecimiento micelial de T01. En la segunda hilera se dispersaron conidios de T01 sobre la superficie de la caja y el ACB bacteriano fue inoculado en cinco puntos. La tercera hilera corresponde a la prueba de confrontación en donde el ACB bacteriano se colocó en un extremo de la caja y T01 en el extremo opuesto.

*Pseudomonas putida* S4 fue incompatible con *T. atroviride* T0X pues redujo la velocidad de crecimiento del micelio e inhibió la formación de conidios, y *P. tolaasii* A46, aunque causó un ligero retraso en el crecimiento micelial de *T. atroviride* T0X, este último se desarrolló y produjo conidios de forma similar al control, por lo tanto se catalogó como compatible (Figura 2.7).



**Figura 2.7. Interacción *in vitro* entre los ACB bacterianos (S4 y A46) y el ACB fúngico *Trichoderma atroviride* T0X.** En la primera hilera de cajas Petri los ACB bacterianos se dispersaron sobre la superficie y en seguida se colocaron discos de crecimiento micelial de T0X. En la segunda hilera se dispersaron conidios de T0X sobre la superficie de la caja y el ACB bacteriano fue inoculado en cinco puntos. La tercera hilera corresponde a la prueba de confrontación en donde el ACB bacteriano se colocó en un extremo de la caja y T0X en el extremo opuesto.

En los bioensayos, en los que primero se dispersaron los conidios de uno de los hongos (*T. virens* T01 o *T. atroviride* T0X) solamente creció el ACB inoculado por dispersión e inhibió al segundo, inoculado por medio de discos con crecimiento micelial. Cuando la siembra de ambos hongos se hizo colocando un disco de cada uno de ellos en los extremos de la caja, no se observó colonización de un micelio sobre otro. Al tomar y sembrar discos de micelio de la zona donde se encontraron los micelios de ambos hongos, sólo fue posible recuperar a *T. virens*, por lo que la interacción fue considerada como incompatible (Figura 2.8).



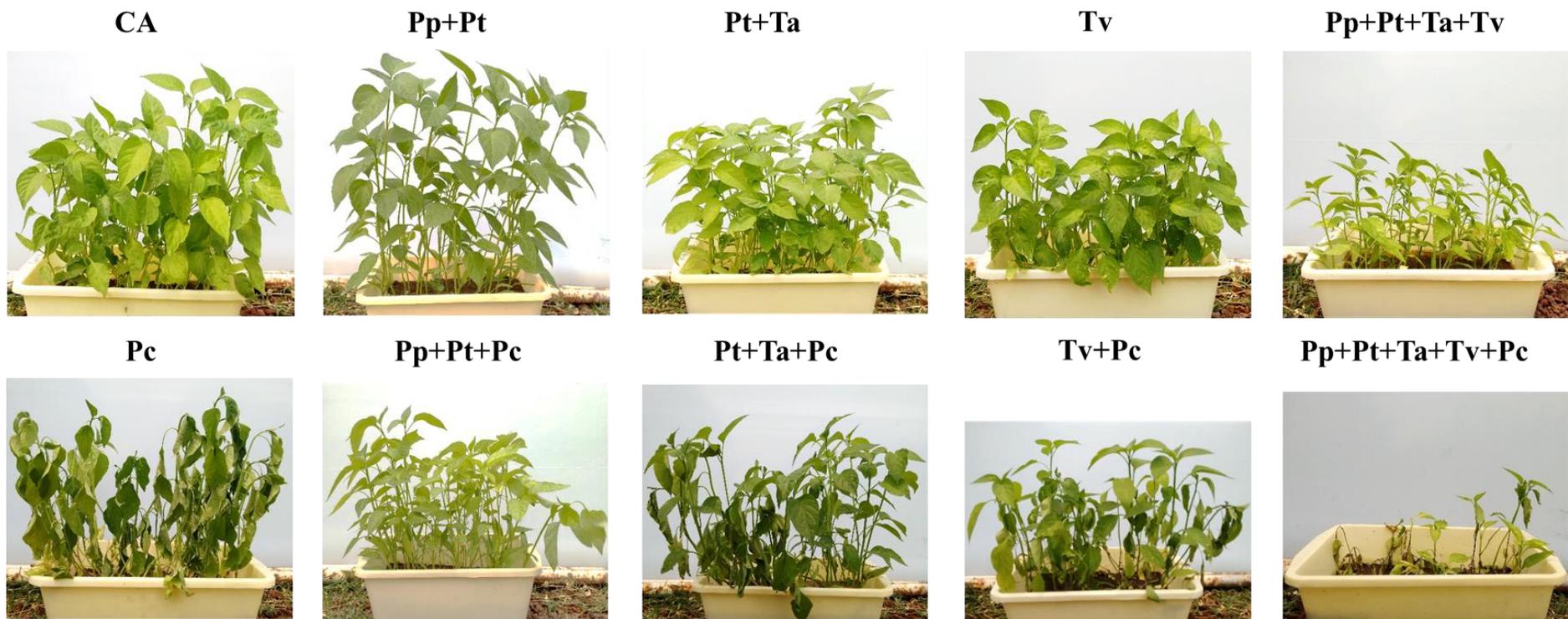
**Figura 2.8. Confrontaciones *in vitro* entre *Trichoderma virens* T01 y *Trichoderma atroviride* T0X.** En la primera hilera de cajas Petri se dispersaron conidios de T01 sobre toda la caja y en la segunda se dispersaron conidios de T0X. La tercera hilera corresponde a la prueba de confrontación donde se colocó un disco de cada antagonista en los extremos de la caja.

### **Bioensayos de control biológico en condiciones de invernadero**

Con base en los resultados de las pruebas de antagonismo (Cuadros 2.6 y 2.7; Figuras 2.2 y 2.3), de promoción de crecimiento (Cuadro 2.8; Figura 2.4) y de compatibilidad (Figuras 2.5, 2.6, 2.7, 2.8), se probaron los consorcios mostrados en el Cuadro 2.3.

A los 7 días posteriores a la inoculación de las plantas de chile Jalapeño con *P. capsici*, se observó la pérdida de turgencia en la parte aérea (Figura 2.9) y lesiones necróticas en cuello y parte superior de las raíces. El grado de pudrición (porcentaje de área necrosada) en raíces y cuello de las plantas varió dependiendo del tratamiento (Figura 2.10). La mortalidad de plantas ocurrió a los 15 días posteriores a la inoculación del fitopatógeno, y la mayor incidencia de plantas enfermas y muertas se registró en el

tratamiento donde se inoculó solamente a *P. capsici* (99.69%), las plantas que sobrevivieron mostraron un 36.85% de área necrosada (severidad). El consorcio conformado por *Pseudomonas putida* S4 y *Pseudomonas tolaasii* A46 (Pp+Pt+Pc) destacó por el grado de protección conferido a las plantas contra *P. capsici*, reduciendo significativamente tanto la incidencia de plantas enfermas (solo 24% de las plantas enfermaron), como la severidad (reduciendo 90% el área necrosada). Así mismo en ausencia del patógeno, el consorcio Pp+Pt incrementó significativamente el peso seco de la planta (11%) y el área radical (38%), con respecto al control absoluto (Cuadro 2.10). El consorcio de *P. tolaasii* A46 + *T. atroviride* T0X (Pt+Ta+Pc) también mostró un buen efecto de protección reduciendo la incidencia de la enfermedad en un 57% y la severidad en un 69%; no obstante, en ausencia del oomiceto (Pt+Ta) se redujo la biomasa y el área radical con respecto al control absoluto (Cuadro 2.10). En las plantas tratadas con el consorcio *P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46 + *T. vires* T01 + *T. atroviride* T0X y el patógeno (Pp+Pt+Tv+Ta+Pc), no hubo reducción en la incidencia de la enfermedad; sin embargo, la severidad se redujo en un 26%. El desarrollo de la planta fue significativamente reducido cuando se inoculó con el consorcio de los cuatro ACB (Pp+Pt+Tv+Ta) en ausencia del oomiceto (Cuadro 2.10).



**Figura 2.9. Efecto de los ACB sobre la incidencia y severidad de la marchitez de chile jalapeño inoculado con *Phytophthora capsici*. Efecto observado a los 15 días después de la inoculación con el patógeno. CA: Control Absoluto; Pc: *Phytophthora capsici*; Pp: *Pseudomonas putida* S4; Pt: *Pseudomonas tolaasii* A46; Ta: *Trichoderma atroviride* T0X; Tv: *Trichoderma virens* T01.**

**Figura 2.10** Necrosis en raíces y cuello, indicada por la coloración magenta en plantas de chile jalapeño inoculadas con ACB y *Phytophthora capsici*. **CA:** Control Absoluto; **Pc:** *Phytophthora capsici*; **Pp:** *Pseudomonas putida* S4; **Pt:** *Pseudomonas tolaasii* A46; **Ta:** *Trichoderma atroviride* T0X; **Tv:** *Trichoderma viride* T01.



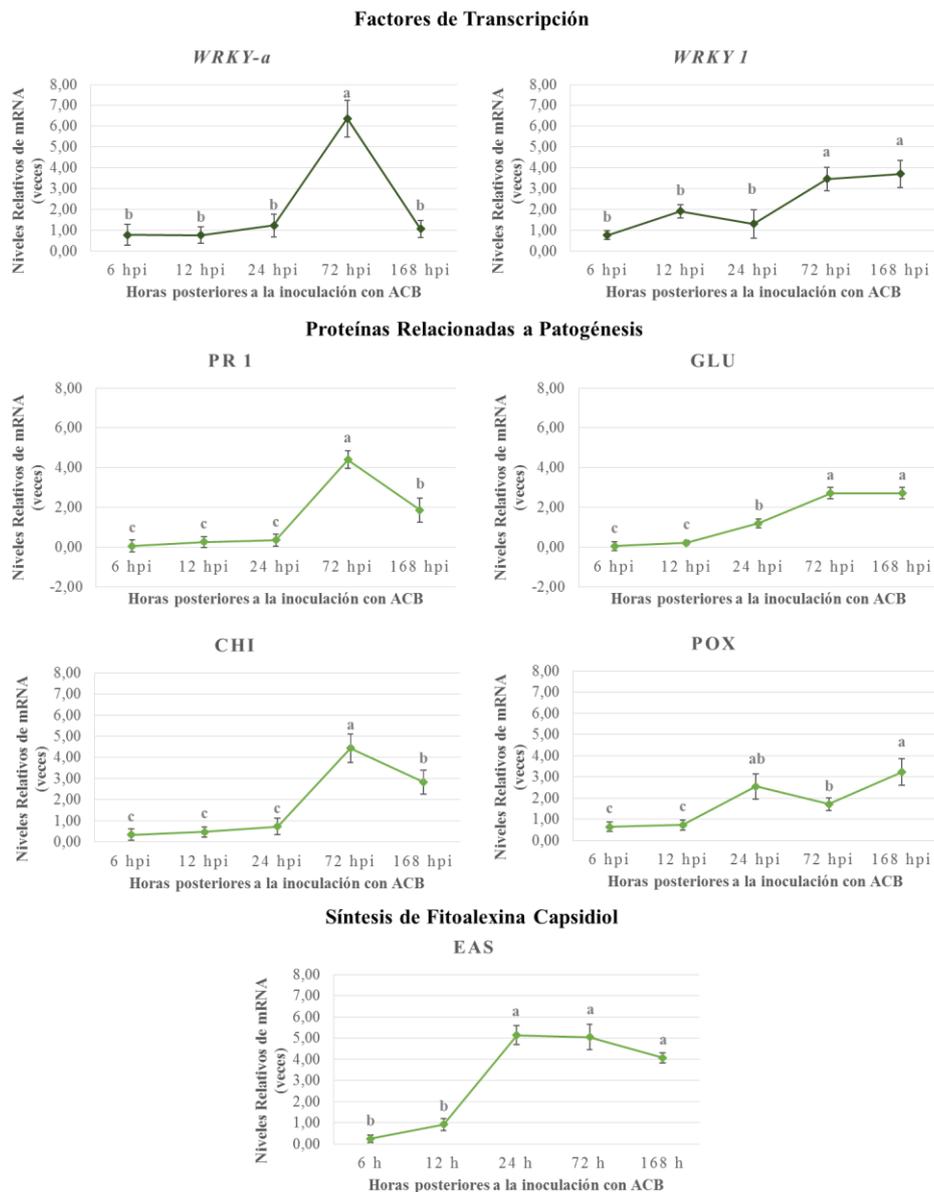
**Cuadro 2.10.** Efecto de los ACB sobre la incidencia, severidad, área radical sana y peso seco en plantas de chile jalapeño inoculadas con *Phytophthora capsici*.

Clave	Tratamiento	Incidencia		Área Necrosada		Área Radical <sup>π</sup>	Peso Seco Total
		% <sup>ψ</sup>		% <sup>ψ</sup>		(mm <sup>2</sup> ) <sup>ψ</sup>	(mg) <sup>ψ</sup>
Pp+Pt	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46	0.00	A	0.00	A	3107	A
Pt+Ta	<i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. atroviride</i> T0X	0.00	A	0.00	A	1655	C
Tv	<i>T. viride</i> T01	0.00	A	0.00	A	1159	D
Pp+Pt+Ta+Tv	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. virens</i> T01 / <i>T. atroviride</i> T0X	0.00	A	0.00	A	633,8	E
CA	Control Absoluto	0.00	A	0.00	A	2251	B
Pc	<i>P. capsici</i>	99.69	E	36.85	F	592.40	EF
Pp+Pt+Pc	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46 / <i>P. capsici</i>	24.38	B	3.67	B	1742.33	BC
Pt+Ta+Pc	<i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. atroviride</i> T0X / <i>P. capsici</i>	43.13	C	11.40	C	1228.45	D
Tv+Pc	<i>T. viride</i> T01 / <i>P. capsici</i>	84.06	D	16.61	D	917.39	D
Pp+Pt+Ta+Tv+Pc	<i>P. putida</i> S4 / <i>P. tolaasii</i> A46 / <i>T. atroviride</i> T0X / <i>T. virens</i> T01 / <i>P. capsici</i>	95.00	E	27.30	E	463.94	F
CV	Coefficiente de Variación	6.90		17.48		4.24	

<sup>π</sup> Para el análisis estadístico los datos fueron sometidos a una transformación logarítmica base 10; se muestran medias de los datos originales. <sup>ψ</sup> Los datos representan la media de ocho repeticiones con 30 plantas cada una. En cada columna los valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ )

### **Expresión de genes de defensa en plantas de chile Jalapeño**

Los siete genes analizados se sobre-expresaron en las raíces de chile Jalapeño inoculadas con el consorcio de ACB Pp+Pt (*P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46) a las 6, 12, 24, 72 y 168 hpi, con respecto a las plantas testigo ( $P \leq 0.05$ ). De todos los genes, el correspondiente al factor de transcripción *WRKY-a* fue el que mostró la mayor acumulación de transcritos, sobre-expresándose 6.36 “veces” más, con respecto a las plantas testigo. *WRKY-a* fue seguido por *EAS*, que de todos los genes, fue el que se sobre-expresó más rápido alcanzando 5.14 veces más transcritos en tan solo 24 hpi. Los genes *WRKY-a*, *PRI*, *GLU* y *CHI* alcanzaron su máxima expresión hasta las 72 hpi, mientras que *WRKY1* junto con *POX*, hasta las 168 hpi. La dinámica de la expresión de los genes *WRKY-a*, *PRI* y *CHI* mostró un patrón similar (Figura 2.11); en los tres casos se registró una baja sobre-expresión durante las primeras 24 hpi, y la máxima a las 72 hpi. La tendencia de sobre-expresión de los genes *WRKY1*, *GLU* y *POX* similar entre ellos, pero diferente a los arriba mencionados, regularmente mostraron un incremento gradual y continuó a lo largo de todos los tiempos evaluados. En contraste, el patrón de expresión del gen *EAS* fue diferente al de los genes anteriores, pues desde las 24 hasta las 168 hpi mantuvo un nivel de expresión relativamente alto.



**Figura 2.11. Acumulación relativa de transcritos de genes asociados con defensa en raíces de plantas de chile jalapeño inoculadas con el consorcio de ACB bacterianos *Pseudomonas putida* S4 y *Pseudomonas tolaasii* A46. *WRKY1* y *WRKY-a*: factores de transcripción; *PRI*: Proteína relacionada con la patogénesis; *GLU*: Glucanasas (PR2); *CHI*: Quitinasas (PR3); *POX*: Peroxidasas (PR9); *EAS*: 5-epi-aristolóqueno sintasa. Cada punto simbolizando un dato representa el promedio de ocho repeticiones, y las líneas sobre cada punto, la desviación estándar. Los niveles relativos de expresión se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen codificante para Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión, y las plantas testigo para calibrar los niveles de transcritos del gen de interés, estos se expresaron como cambios en veces en respuesta al tratamiento en relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1x). Las letras sobre cada punto representan las diferencias significativas en la acumulación de transcritos para cada gen en los diferentes tiempos, los puntos con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ). El experimento completo se repitió una vez.**

## Caracterización polifásica e identificación de la cepa S4

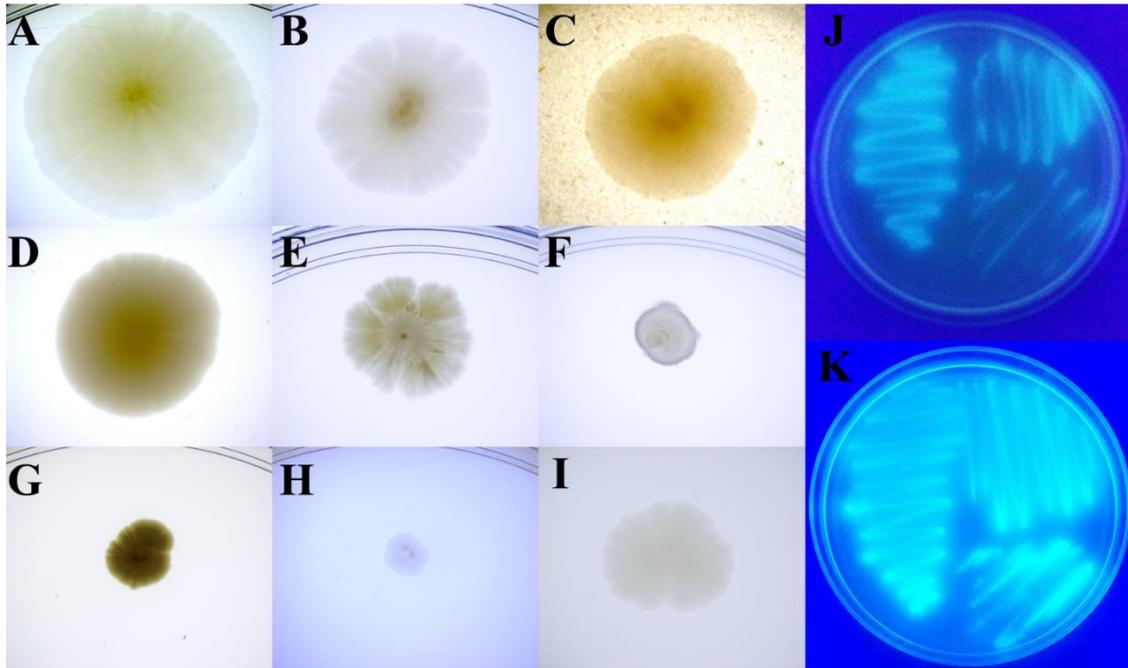
### *Morfología de la colonia*

La cepa bacteriana S4 creció en los nueve medios de cultivo utilizados tras haber sido incubada durante 6 días a  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Cuadro 2.11). En todos los medios de cultivo, la cepa S4 formó colonias irregulares, planas, firmes de bordes ondulados y color de amarillo claro translúcido a crema (Figura 2.12). El medio agar nutritivo promovió un mayor crecimiento de la cepa ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 2.11). En los medios de cultivo agar nutritivo y R2A, produjo un pigmento fluorescente a una longitud de onda 366 nm de luz UV.

**Cuadro 2.11.** Caracterización morfológica de la cepa S4 en diferentes medios de cultivo.

Medio	Diámetro de la colonia $\Psi$	Morfología de la colonia
Agar Nutritivo	18.70 A	Circulares, planas, firme, bordes ondulados, color amarillo claro translúcido
Agua-Agar.	3.36 F	Irregulares, planas, firmes, bordes ondulados, color crema translúcido
B de King	14.5 CD	Circulares, planas, mucoide, bordes redondeados, color crema
Extracto de Levadura-Agar	16.96 B	Irregulares, planas, firme, bordes lobulados, color crema translúcido
Extracto de Malta-Agar	5.29 E	Irregulares, planas, firmes, bordes ondulados, color crema
Harina de Maíz-Agar	5.71 E	Irregulares, planas, firmes, bordes ondulados, color crema
Jugo V8-Agar	14.85 C	Circulares, planas, mucoide, bordes ondulados, color beige
PDA	13.22 D	Irregulares, planas, bordes espiculados, color beige y ambar
R2A	13.37 D	Irregulares, planas, firmes, bordes ondulados, color amarillo translúcido

$\Psi$  Promedio (mm) de seis repeticiones. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 2.12. Morfología de la colonia de la cepa S4 en diferentes medios de cultivo.**  
 A) Agar nutritivo; B) Extracto de levadura-agar; C) Jugo V8-agar; D) B de King;  
 E) Papa-dextrosa-agar; F) Harina de maíz-agar; G) Extracto de malta-agar; H)  
 Agua-Agar; I) R2A; J) Fluorescencia en medio agar nutritivo; K) Fluorescencia  
 en medio R2A.

#### *Caracterización fisiológica y bioquímica de la cepa S4*

La caracterización mediante el sistema informático Omnilog® identificó a la cepa S4 con alta similitud con la especie *Pseudomonas putida* biotipo B; el perfil fisiológico y bioquímico en comparación con otras cepas de *P. putida* se muestra en el cuadro 2.12. Las cepas usadas para la comparación fueron *P. putida* P29 aislada de rizósfera de mostaza (*Brassica campestris* L.) con actividad promotora de crecimiento de la planta (Ahemad y Khan, 2011); *P. putida* PC3 con actividad solubilizadora de fosfatos, aislada de suelos agrícolas con actividad degradadora de plaguicidas organofosforados (Abo-amer, 2012), ambas (P29 y PC3) caracterizadas mediante los métodos estándar del Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa; y *P. putida* ST3, aislada de agua embotellada y caracterizada mediante el sistema API ID 32 GN® para la identificación

de Gram Negativas (Tasic *et al.*, 2014). El análisis comparativo de los resultados de la caracterización indentificó la cepa S4 con una correspondencia del 100% con la cepa de referencia PS9 y del 99% con las cepas PC3 y ST3 de *Pseudomonas putida*.

**Cuadro 2.12.** Caracterización fisiológica y bioquímica de la cepa S4.

Test	Cepas de <i>Pseudomonas putida</i>			
	S4	PS9 <sup>ψ</sup>	PC3 <sup>φ</sup>	ST3 <sup>ε</sup>
Tinción Gram	-	-	-	-
Ryu (KOH)	+	nd	+	nd
Catalasa	+	+	+	nd
Reducción nitratos	+	+	+	nd
Producción Indoles	+	+	-	nd
<b>LOPAT</b>				
Levana	-	nd	nd	nd
Oxidasa	+	nd	+	nd
Pectolítica	-	nd	nd	nd
Arginina	+	nd	nd	nd
Tabaco	-	nd	nd	nd
<b>Asimilación de</b>				
Sorbitol	-	nd	nd	-
Mannitol	-	-	-	-
Myo-inositol	-	nd	nd	-
Myo-inositol	-	nd	nd	-
Gelatina	+	+	+	nd
Gelatina	+	+	+	nd
<b>Sacaridos</b>				
Dextrina	-	-	nd	nd
Maltosa	-	nd	nd	-
Sucrosa	-	-	-	-
Lactosa	-	nd	-	nd
Glucosa	+	nd	+	+
Fucosa	+	nd	nd	-
<b>Aminoácidos</b>				
Serina	+	nd	nd	+
Alanina	+	nd	nd	+

+ Positivo; - Negativo; nd No determinado. <sup>ψ</sup> Ahemad y Khan, 2011.

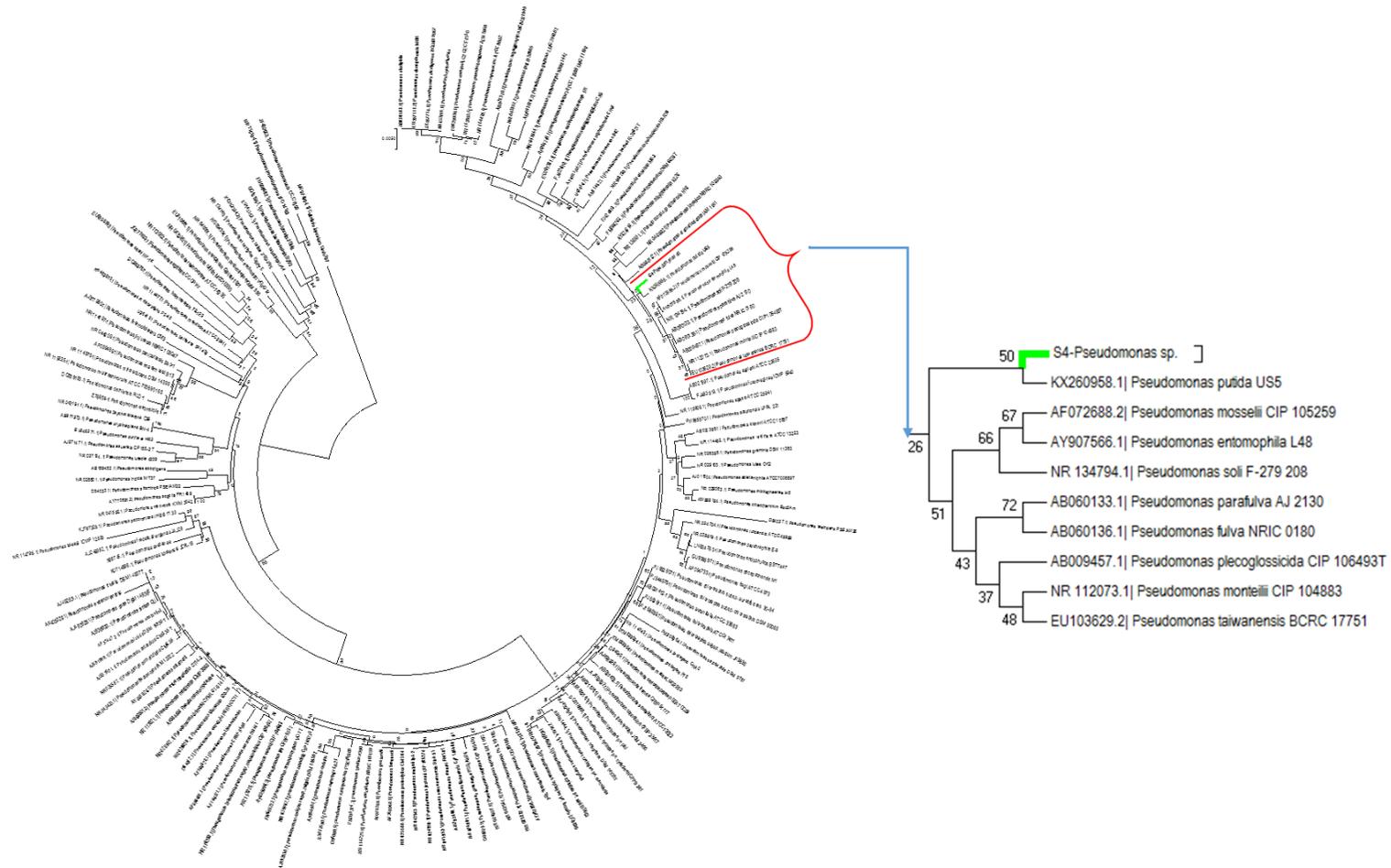
<sup>φ</sup> Abo-Amer, 2012.

### Caracterización genética de la cepa S4

La amplificación y secuenciación de los genes *16s*, *gyr B*, *rpo B* y *rpo D* de la cepa S4, mostró una alta similitud genética (cobertura e identidad) con 17 cepas bacterianas (Cuadro 2.13). Se obtuvieron las secuencias de los cuatro genes de las 17 cepas y se realizó un análisis MLSA incorporando además las secuencias de otras 139 (156 en total) cepas tipo, reportadas en el más reciente análisis filogenético del género *Pseudomonas* (Gomila *et al.*, 2015). Los resultados de la inferencia filogenética a partir del concatenado de los cuatro genes, indicaron que la cepa S4 muestra alta similitud genética con *Pseudomonas putida* (Figura 2.13).

**Cuadro 2.13.** Cepas tipo con alta similitud genética con la cepa S4 mediante secuenciación de los genes *16 s*, *gyr B*, *rpo B* y *rpo D*.

Gen	Cepa tipo	Accesión	Cobertura	Identidad
<i>16 s</i>	<i>P. putida</i> US5	KJX260958.1	100	99
	<i>P. taiwanensis</i> BCRC 17751	EU103629.2	100	99
	<i>P. plecoglossicida</i> CIP 106493T	AB009457.1	100	99
<i>gyr B</i>	<i>P. koreensis</i> JCR-18	KU714598.1	98	92
	<i>P. brassicasearum</i> DBK11	AF100321.1	98	93
	<i>P. brassicasearum</i> sbsp. neoaurantica CIP 109457	NR 116299.1	98	92
	<i>P. kilonensis</i> 520-20	NR 028929.1	99	91
<i>rpo B</i>	<i>P. protegens</i> CHA0	NR 1147491.1	99	93
	<i>P. chlororaphis</i> ATCC17411	FJ652611.1	100	93
	<i>P. aurantica</i> ATCC 33663	AB021412.1	100	93
	<i>P. monteilii</i> CIP 104883	NR 12073.1	100	93
<i>rpo D</i>	<i>P. fluorescens</i> IAM 12022	NR 043420.1	100	91
	<i>P. corrugata</i> PSEATCC11	D84012.1	100	88
	<i>P. saponiphila</i> DSM 9751	FM208264.1	89	90
	<i>P. mediterranea</i> CFBP 5488	AF386081.1	99	88
	<i>P. frederiksbergensis</i> JAJ28	AJ249382.1	99	88
	<i>P. usmongensis</i> Ps 3-10	NR 025227.1	100	88



**Figura 2.13.** Árbol filogenético generado a partir de la concatenación de cuatro genes (*16s*, *gyr B*, *rpo B* y *rpo D*) para la identificación molecular de la cepa S4 mediante el análisis de secuencias multilocus (MLSA). La inferencia filogenética fue calculada mediante el algoritmo de Jukes-Cantor. El dendrograma fue construido mediante el método de Neighbor-Joining. *Cellvibrio japonicus* UEDA107 fue utilizado como cepa fuera de grupo. Las secuencias de las cepas tipo de referencia fueron obtenidas de las bases de datos del NCBI, del *Pseudomonas* Genome DataBase (PGDB) (Winsor *et al.*, 2015) y del Pseudo MLSA Database (PMD) (Bennasar *et al.*, 2010).

## DISCUSIÓN

Naturalmente, los microorganismos presentes en rizósfera y suelo interactúan de forma constante y dinámica, entre sí y con las plantas; de tal manera que se establece un equilibrio determinado en gran medida por la biodiversidad. La amplia red de interacciones que se establece es regulada por las capacidades fisiológicas que permiten a los microorganismos establecerse y desarrollarse exitosamente, es decir, por su aptitud biológica (Whipps, 2001). A través del tiempo, los microorganismos asociados a cada planta en particular se han hecho más específicos, siendo un factor importante que determina el estado de salud o enfermedad en una planta bajo ciertas circunstancias (Berendsen *et al.*, 2012). Así pues, uno de los más grandes retos para el control biológico es encontrar a los microorganismos que sean capaces de adaptarse al cultivo de interés y a las condiciones físicas, químicas y biológicas del sustrato en donde pretenden introducirse (Jain *et al.*, 2013).

En la presente investigación del total de ACB estudiados, destacaron *Pseudomonas putida* S4 y *Trichoderma virens* T01 por su antagonismo *in vitro* contra *P. capsici*, *P. ultimum*, *R. solani* y *F. oxysporum* (Cuadros 2.6, 2.7); y *Pseudomonas tolaasii* A46 y *T. atroviride* T0X por su efecto de promoción del crecimiento en plantas de chile Jalapeño (Cuadro 2.8). Los géneros *Pseudomonas* y *Trichoderma* son muy versátiles, ya que muestran alta capacidad de adaptación y diversas aptitudes fisiológicas que les permiten actuar como excelentes ACB (Kubicek y Druzhinina, 2013; Berg y Hallmann, 2006). Entre las especies del género *Pseudomonas* que con mayor frecuencia se reportan como ACB se encuentran: *P. chlororaphis*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. protegens* y *P. putida*, que destacan por su habilidad para colonizar la rizosfera de diversos cultivos, producir antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, factores de crecimiento e inducir resistencia sistémica en las plantas (Mercado-Blanco,

2015). Algunos biofungicidas formulados con especies de *Trichoderma* como: *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. polysporum*, *T. viride* y *T. virens*, controlan eficazmente a fitopatógenos fúngicos como *Botrytis cinerea*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* y a algunas especies de los géneros *Armillaria*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Verticillium* (Woo *et al.*, 2014). Las especies de *Trichoderma* destacan por su capacidad de parasitar a otros hongos, producir enzimas líticas e inducir resistencia sistémica (Lorito y Woo, 2015).

De los consorcios probados en nuestro estudio, el formado por *Pseudomonas putida* S4 + *Pseudomonas tolaasii* A46 destacó por reducir significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad (Cuadro 2.10, Figuras 2.9, 2.10). El control biológico ejercido por bacterias del género *Pseudomonas* se atribuye con frecuencia a su capacidad de producir antibióticos antifúngicos como fenazina, pirrolnitrina, pioluteorina y 2,4 diacetilfloroglucinol (Fernando *et al.*, 2005). Sin embargo, la diversidad genética de este género es muy amplia y no todas las especies son productoras de antibióticos. Por ejemplo, en *P. putida* PCI2 no se detectaron genes relacionados con la producción de antibióticos, no obstante, la cepa fue un excelente ACB de *S. rolfisii* y *F. oxysporum* en plantas de jitomate (Pastor *et al.*, 2016). En general, las especies de *Pseudomonas* son capaces de producir diversas moléculas de interés biológico como los ramnolípidos, lipopéptidos y compuestos volátiles, que no son considerados como antibióticos, pero presentan actividad antimicrobiana. El polipéptido tolaasina producido por *P. tolaasii* durante la fase de crecimiento exponencial, es capaz de disgregar la membrana celular de diversos hongos y de bacterias Gram positivas (Baindara y Korpole, 2016). *P. putida* BP25, produjo 72 metabolitos volátiles tóxicos, destacando los compuestos heneicosano, pirrolo [1,2- $\alpha$ ] pirazina-1-4-dione, hexahidro-3-(2-metilpropil) y la pirazina 2,5-dimetil, a los que se atribuyó el efecto nocivo observado *in vitro* contra oomicetos (*P. capsici* y

*Pythium myriotylum*), hongos (*R. solani*, *Gibberella moniliformis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Athelia rolfsii*) y al nematodo barrenador *Radophulus similis* (Sheoran *et al.*, 2015). Los sideróforos son otro tipo de biomoléculas producidas por las diversas especies de *Pseudomonas*; *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia* y *P. tolaasii* producen cantidades considerables de estas moléculas quelantes de hierro (Sayyed *et al.*, 2013). La capacidad de *P. putida* WCS358 para competir por nutrientes como el hierro, se relaciona con su habilidad para utilizar sus sideróforos (pseudobactin 358) y los producidos por otros microorganismos debido a que posee receptores transmembranales especiales codificados por los genes *PupA* y *PupB*; su capacidad para controlar la marchitez por *Fusarium* sp. en clavel y rábano, y el damping-off por *Pythium* spp. y *B. cinerea* en jitomate se atribuyó a este mecanismo (Mercado-Blanco, 2015). La producción de enzimas como quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas, juega un papel importante en el control biológico ejercido por algunas especies como *P. corrugata* P94 (Trivedi *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2007) y *P. fluorescens* CHA0 (Sacherer *et al.*, 1994). En el presente estudio se evidenció la capacidad de las cepas *P. putida* S4 y *P. tolaasii* A46 para producir sideróforos, proteasas y lipasas-esterasas bajo ciertas condiciones (Cuadro 2.9); así que estos mecanismos podrían estar implicados en la inhibición *in vitro* de los fitopatógenos y en el efecto de protección en plantas de Chile mostrado en los bioensayos bajo condiciones de invernadero. Otros mecanismos como la producción de compuestos volátiles o lipopéptidos podrían también estar participando; así mismo, la acción conjunta de varios de estos mecanismos explicaría el amplio espectro mostrado por estas bacterias.

La biofertilización (capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y de solubilizar fosfatos) (Gaiero *et al.*, 2013; Bashan, 1998) y la fitoestimulación (capacidad de producir y regular fitohormonas) (Bloemberg y Lugtenberg, 2001) son mecanismos considerados como complementarios deseables en los ACB. Se ha demostrado que cepas como *P.*

*tolaasii* EIXb son capaces de promover el crecimiento y el rendimiento en maíz (*Zea mays* L.) debido a su capacidad para solubilizar fosfatos (Viruel *et al.*, 2014), y que *P. tolaasii* ACC23 induce una mejora en la arquitectura radical, promueve el crecimiento y la tolerancia a estrés por cadmio en canola (*Bassica napus*), debido a la acción conjunta de la producción de indoles, ACC desamina y sideróforos (Dell'Amico *et al.*, 2008). En nuestro estudio se observó un incremento en el área radical y en el peso seco de la planta completa, únicamente en las plantas inoculadas con el consorcio de *Pseudomonas* (Pp+Pt) (Cuadro 2.10). Las pruebas de actividad fisiológica evidenciaron la capacidad de ambas *Pseudomonas* para fijar nitrógeno, producir indoles y solubilizar fosfatos; *P. tolaasii* A46 destacó en ésta última prueba. Los hongos *T. virens* T01 y *T. atroviride* T0X solo fueron capaces de producir indoles (Cuadro 2.8). Con base en lo antes mencionado, podemos argumentar que el efecto de incremento en el área radical y en el peso seco de las plantas inoculadas con el consorcio de *Pseudomonas* (Pp+Pt), posiblemente se deba a la acción conjunta de sus capacidades de biofertilización y fitoestimulación.

La importancia de que los ACB exhiban estos mecanismos de control llamados “secundarios”, va más allá del aporte de nutrientes y factores de crecimiento. Resultados obtenidos en algunos estudios permiten especular que los ácidos orgánicos producidos por *B. subtilis* y *P. fluorescens*, involucrados en la solubilización de fosfatos, intervienen en la inhibición de la marchitez por *Fusarium* spp. en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) (Vassilev *et al.*, 2006). También se ha informado que los indoles producidos por *P. aeruginosa* TO3 inhiben a *Macrophomina phaseolina in vitro* y en planta de garbanzo (*Cicer arietinum* L.); cuando se utilizó un mutante (*P. aeruginosa* TO<sub>52</sub>) deficiente en la producción de indoles, se observó una reducción significativa del control biológico (Khare y Arora, 2010). La implicación de los indoles en el control de fitopatógenos también se evidenció en papa (*S. tuberosum* L.), pues al tratar las hojas con ácido indol

acético se disminuyó la severidad del ataque de *Phytophthora infestans* e inhibió su crecimiento *in vitro* (Martínez-Noël *et al.*, 2001). El esclarecimiento del papel de los mecanismos secundarios en el control biológico de fitopatógenos con origen en el suelo, es fundamental para hacer más eficiente el uso de los ACB.

Aun cuando los ACB muestran resultados alentadores en los estudios *in vitro*, sus efectos al inocularlos en planta pueden ser variables. Por ejemplo, el consorcio *P. aeruginosa* BJ10-86 y *T. hamatum* THSW13 ejerció control contra *P. capsici*, pero no mejoró la germinación de semillas ni el peso seco de plantas de chile (Chemeltorti *et al.*, 2017). En nuestro estudio, el consorcio conformado por *P. tolaasii* A46 y *T. atroviride* TOX (Pt+Ta+Pc) fue capaz de proteger a las plantas reduciendo significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad, sin embargo, hubo reducción en el peso seco de la planta y en el área radical; en las plantas tratadas solo con *T. virens* T01 se observó un efecto similar (Cuadro 2.10, Figura 2.9). En las plantas inoculadas con los cuatro ACB y el oomiceto (Pp+Pt+Ta+Tv+Pc), la incidencia de la enfermedad fue igual que en aquellas inoculadas sólo con el patógeno (Pc) y las inoculadas sólo con los cuatro ACB (tratamiento Pp+Pt+Ta+Tv) fueron las que presentaron el menor desarrollo (Cuadro 2.10, Figura 2.9). Aunque las cepas de *Trichoderma* se han catalogado como excelentes agentes de control biológico, es claro que no todas promoverán efectos positivos sobre los cultivos en los que se inoculan. *T. harzianum* 2413 ampliamente reconocida por su capacidad micoparasítica fue capaz de retardar la aparición de síntomas provocados por *P. capsici* en pimiento, pero, redujo el porcentaje de germinación de semillas (Ezziyani *et al.*, 2004). Otras cepas parecen no poder adaptarse al cultivo en el que se inoculan. Bae y colaboradores (2011) aislaron diferentes cepas de *Trichoderma* de hábitos endofíticos en cacao (*Theobroma cacao*) y la mayoría fue capaz de inducir resistencia sistémica al inocularlas en chile; sin embargo, observaron que *T. caribbeanum* var. *aequatoriale*

DIS320c secretaba sustancias que dañaban severamente el sistema radical de las plantas de Chile. Estudios como los realizados por Lee *et al.*, (2016) muestran que el perfil de compuestos volátiles producidos por cepas de *Trichoderma* promotoras de crecimiento puede ser igual al de cepas como *T. atroviride* CBS10-209, el cual provocó un impacto negativo en el tamaño, peso seco y contenido de clorofila en plantas de Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-7) y de jitomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Ponderosa), la diferencia radicó en que ésta última producía una cantidad mucho mayor de dichos compuestos

El estudio de consorcios de ACB aún continúa siendo un reto para la investigación, ya que las probabilidades de obtener mejoras al co-inocular diferentes ACB son limitadas e incluso pueden obtenerse resultados adversos, los cuales se deben en gran medida a la incompatibilidad entre los ACB al utilizarlos en experimentos en planta (Sarma *et al.*, 2015). Por ejemplo, Ballesteros-Almanza y colaboradores (2010), al combinar la micorriza *Glomus intraradices* con diferentes cepas de *Rhizobium* spp., observaron que el peso seco y la resistencia al estrés hídrico en plantas de frijol (*P. vulgaris* cv. Pinto Villa y cv. Flor de Mayo) fue mucho menor en comparación con las plantas no inoculadas; en cambio, cuando se inocularon por separado sí incrementaron la resistencia al estrés hídrico. Posiblemente el factor más importante que afecta el desempeño de los ACB en consorcio o por separado es la composición microbiológica y las características físico-químicas del suelo en el que se inoculan. Hubbard y colaboradores (1983), reportaron que la alta eficiencia de *T. hamatum* para controlar a *P. ultimum* en chícharo bajo condiciones de invernadero, disminuía drásticamente al sembrar las semillas inoculadas en suelo naturalmente infestado por *P. ultimum*; tras una serie de análisis concluyeron que las *Pseudomonas* presentes en el suelo natural colonizaban las semillas limitando la capacidad de protección de *T. hamatum*. Se ha

demostrado que tanto cepas de *Pseudomonas* (Mercado-Blanco, 2015) como de *Trichoderma* (Daguerre *et al.*, 2016) son altamente influenciadas por la composición microbiológica del suelo en el que se inoculan, ya sean microorganismos nativos, fitopatógenos o ACB; bajo estas circunstancias generan una mayor cantidad de antibióticos, metabolitos secundarios tóxicos, enzimas líticas y sideróforos con la finalidad de competir por el espacio y el alimento que la planta provee.

El fenómeno de resistencia en las especies de *Capsicum* y las respuestas de defensa que lo acompañan, distan de ser comprendidas en su totalidad. Para algunos cultivares, la resistencia depende del estado fisiológico en el que se encuentre la planta y en otros de la cantidad de inóculo del patógeno con el que interactúen (Castro-Rocha *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado que algunas variedades comerciales de Chile son capaces de resistir el ataque de *P. capsici* en presencia de ciertos microorganismos con capacidades antagónicas o de promoción de crecimiento (Park *et al.*, 2013; Veloso y Díaz, 2012; Ezziyyani *et al.*, 2011; Robles-Yerena *et al.*, 2010). La rapidez y la magnitud con la que se expresan los genes relacionados con la defensa, son un factor crucial que determina la resistencia, susceptibilidad o tolerancia de la planta a los fitopatógenos (Villar-Luna *et al.*, 2015a, 2005b; Castro-Rocha *et al.*, 2012; Fernandez-Herrera *et al.*, 2012). Entre éstos, los genes *WRKY-a* y *WRKY1* que codifican los factores de transcripción *WRKY-a* y *WRKY1*, se asocian con la activación o supresión de genes de defensa en diversas interacciones de la planta con el medio (Rushton *et al.*, 2010). La expresión del gen *WRKY-a* es casi en su totalidad exclusiva del tejido radical en plantas de Chile, posiblemente como resultado de la adaptación evolutiva por la exposición continua a diferentes tipos de estrés; su sobre-expresión acompaña la expresión de genes marcadores de resistencia como *PRI* y a la acumulación de fitohormonas (ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno) involucradas en las rutas de señalización que activan las

respuestas de defensa (Park *et al.*, 2006). La función de la proteína PR1 aún es desconocida; se especula sobre una posible acción tóxica que prevé la colonización por fitopatógenos ya que se ha localizado rodeando el micelio de *P. capsici* en el apoplasto de plantas de pimiento (Lee *et al.*, 2000a). PR1 es considerada como un marcador de activación de las defensas inducidas en la planta, se ha observado su sobre-expresión en la inducción de resistencia por medio de elicitores sintéticos (Beatrice *et al.*, 2017), en la inducción de resistencia sistémica por medio de agentes de control biológico (Kefalogianni *et al.*, 2017) y de patógenos avirulentos (Angelopoulou *et al.*, 2014), y en la interacción incompatible entre la línea de chile resistente CM334 y *P. capsici* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). El gen *CHI* codifica para las proteínas quitinasas básicas de tipo II (PR2), las cuales se observaron en apoplasto y tejido vascular en la interacción entre pimiento y *P. capsici* (Lee *et al.*, 2000b). Aunque el género *Phytophthora* aparentemente carece de quitina, la hidrólisis de la pared celular del oomiceto por acción de PRs, produce pequeñas cantidades de N-acetil-glucosamina como subproducto, la cual, solo puede ser generada por CHI en presencia de quitina o glicoproteínas (Kim y Hwang, 1994). Así mismo, se ha evidenciado que una alta acumulación de CHI en chile inoculado con *P. capsici*, es capaz de inhibir la germinación de zoosporas e inhabilitar los tubos germinativos, reduciendo la incidencia de la infección (Kim y Hwang, 1996). En las interacciones incompatibles chile CM334/*P. capsici* (Villar-Luna *et al.*, 2015a) y chile CM334/ *Meloydogine incognita* (Villar-Luna *et al.*, 20015b), se registró un incremento en la acumulación de transcritos de los genes *WRKY-a* y *PR1*. En berenjena (*Solanum melongena* cv. Black beauty), inoculada con el ACB *Paenibacillus alvei* K165, se observó que el incremento en la acumulación de transcritos del gen *PR1* fue acompañado por el incremento simultáneo en la acumulación de transcritos del gen *CHI*, resultando en la inducción de resistencia contra *Verticillium dahliae* (Angelopoulou *et*

al., 2014). En Chile inoculado con una cepa avirulenta de *F. oxysporum* Fo47 se observó que la acumulación de transcritos del gen *PRI* fue acompañada por el incremento de los genes *CHI* y de una sesquiterpeno ciclasa tipo 1 (*SCI*), resultando en la inducción de resistencia hacia la marchitez causada por *P. capsici* y *V. dahliae* (Veloso y Díaz, 2012). En nuestro estudio se observó una tendencia similar en la dinámica de sobre-expresión de los genes *WRKY-a*, *PRI* y *CHI*, coincidiendo con lo reportado en la literatura.

El factor de transcripción *WRKY1* se ha asociado a una regulación negativa de las respuestas de defensa. Mediante el silenciamiento del gen *WRKY1* inducido por virus en hojas de pimiento cv. Bukang, se observó una mayor capacidad de defensa ante la infección por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*; mientras que la sobre expresión del mismo gen en tabaco (*Nitiana tabacum* L.) redujo los niveles de defensa ante la infección por *P. syringae* y *Tobacco mosaic virus* (Oh *et al.*, 2008). También, la sobre-expresión del factor de transcripción *WRKY1* de uva (*Vitis vinífera* L.) en tabaco, lo volvió susceptible a varios hongos (Padney y Somssich, 2009) y al interferir con la expresión de *WRKY1* en cebada (*Hordeum vulgare* L.), ésta se volvió resistente a la cenicienta causada por *Goloviromyces orontii* (Shen *et al.*, 2007). Algunos autores sugieren que *WRKY1* bloquea las respuestas de defensa y la resistencia sistémica adquirida (SAR) cuando hay niveles subóptimos de ácido salicílico (Wang *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2004).

Las proteínas PR9 (peroxidasas, codificadas por el gen *POX*) son enzimas multifuncionales que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidan fenoles para lignificar la pared celular, producen especies reactivas de oxígeno, participan en la respuesta de hipersensibilidad y en procesos de suberización (Passardi *et al.*, 2004). Se ha observado que en plantas susceptibles a *P.capsici* ambos genes *WRKY1* y *POX* incrementan de manera drástica, mientras que en interacciones incompatibles su expresión es moderada y va acompañada con el incremento de ácido jasmónico y etileno (Yi *et al.*, 2010; Ueeda *et al.*, 2006). En

nuestro estudio se observó que en plantas tratadas con el consorcio de *Pseudomonas*, la expresión de *WRKY1* fue mayor que la de *POX* y ambos alcanzaron la máxima expresión a las 168 hpi. El gen *GLU* incrementó gradualmente con el tiempo, con un patrón de expresión similar al de *WRKY1* y *POX*. Las glucanasas rompen  $\beta$ -1,3-D glucanas de la pared celular de los oomicetos, y en plantas resistentes su expresión aumenta de forma gradual a través del tiempo (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). El gen *EAS*, involucrado en la producción de la fitoalexina capsidiol, se ha relacionado estrechamente con la resistencia del chile a *P. capsici*; una rápida y abundante acumulación de ésta fitoalexina en el tejido circundante a la zona de infección, resulta en altos niveles de resistencia al oomiceto (Villar-Luna *et al.*, 2009; Egea *et al.*, 1996). En estudios en donde se ha obtenido protección contra el oomiceto mediante la inoculación de ACB también se ha observado una acumulación acelerada y abundante de transcritos y de fitoalexina (Bae *et al.*, 2011; Ozgonen y Erkilic, 2007; Ahmed *et al.*, 2000). En la presente investigación la mayor expresión de *EAS* se registró a las 24 hpi, y fue el gen que se sobre-expresó de forma más acelerada y con mayor magnitud en las plantas inoculadas con el consorcio de *Pseudomonas*; su patrón de expresión fue diferente al que se observó para los genes que codifican para los factores de transcripción WRKY-a y WRKY1. Habrá que determinar si en realidad estos factores no median su expresión o si son otros factores de transcripción los involucrados.

## CONCLUSIONES

1. *Pseudomonas putida* S4 y *Trichoderma virens* T01 mostraron el mayor potencial antagonico contra *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. *P. tolaasii* A46 y *T. atroviride* ejercieron el mayor efecto de promoción de crecimiento en plantas de chile Jalapeño.
2. Los ACB compatibles fueron: *Pseudomonas putida* S4 y *Pseudomonas tolaasii* A46 y, *P. tolaasii* A46 y *T. atroviride* T0X; en cambio *T. virens* T01 no fue compatible con ningún otro ACB.
3. Con el consorcio *P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46 se obtuvo la mayor reducción en la incidencia y severidad de la enfermedad, y en ausencia del patógeno incrementó el peso seco de la planta completa y el área radical.
4. Todos los genes se sobre-expresaron en las plantas inoculadas con el consorcio *P. putida* S4 + *P. tolaasii* A46. El gen *WRKY-a* fue el que presentó la mayor expresión y *EAS* alcanzó su máxima expresión en menor tiempo con respecto a los demás genes.

## LITERATURA CITADA

- Ahmed, A.S., Pérez C.S. Candela, M.E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology*. 106:817-824.
- Angelopoulou, D.J., Naska, E.J., Paplomatas, E.J., Tjamos, E.S. (2014). Biological control agents (BCAs) of verticillium wilt: influence of application rates and delivery method on plant protection, triggering of host defense mechanisms and rhizosphere populations of BCAs.
- Annapurna, K., Kumar, A., Kumar, L.V., Govindasamy, V., Bose, P., Ramadoss, D. (2013). PGR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Diseases Management. *In: Bacteria in Agrobiolgy: Diseases Management*. (Ed) Maheshwari, D.K. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 405-425.
- Atlas, R.M. 2005. *Handbook of media for environmental microbiology*. Second edition. CRC Press, Boca Raton, Florida. 544 p.
- Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.S., Strem, M.D., Park., S.C., Ryu., C.M., Melnick, R.L., Bailey, B.A. (2011). Endophytich *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24:336-351.
- Baindara, P., Korpoe, S. (2016). Lipopeptides: Status and strategies to control fungal infection. *In: Recent trends in antifungal agents and antifungal therapy*. (Ed) Basak, A. *et al.* Ed. Springer India. Pp. 97-121.
- Ballesteros-Almanza, L., Altamirano-Hernandez, J., Peña-Cabriales, J.J., Santoyo, G., Sanchez-Yañez, J.M., Valencia-Cantero, E., Macías-Rodríguez, L., Lopez-Bucio, J., Cardenas-Navarro, R., Farias-Rodríguez, R. (2010). Effect of Co-Inoculation with Mycorrhiza and Rhizobia on the Noduel Trehalose Content of Different Bean Genotypes. *The Open Microbiology Journal*. 4:83-92.
- Bashan, Y. (1998). Inoculation of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Science*. 16:729-770.
- Bautista-Calles, J., García-Espinosa, R., Zavaleta-Mejía, E., Pérez-Moreno, J., Montes-Blmont, R, Ferrera-Cerrato, R., Huerta-Lara, M. (2010). Disminución de la marchitez del chile (*Phytophthora cpasici* Leo.) con complejidad ascendente de

- antagonistas en el sustrato de germinación de chile (*Capsicum annuum* L.). *Interciencia*. 35:613-618.
- Beatrice, C., Linthorst, J.M.H., Cinzia, F. (2017). Enhancement of *PR1* and *PR5* gene expressions by chitosan treatment in kiwifruit plants inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *actiniciae*. *European Journal of Plant Pathology*. 148:163-179.
- Bennasar, A., Mulet, M., Lalucat, J., García-Valés, E. (2010). PseudoMLSA: a database for multigenetic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiology*. 10:118.
- Berg, G., Hallmann, J. (2006). Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. *In: Soil Biology, Volume 9 Microbial Root Endophytes*. (Eds) Schulz, B. *et al.* Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 53-69.
- Berendsen, R.L., Peters, C.M., Bakker, P.A. (2012). The rhizosphere microbe and plant health. *Trends in Plant Science*. 17:478-486
- Bloemberg, G.V., Lugtengberg, B.J.J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*. 4:343-350.
- Brozová, J. 2004. Mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. in plant protection. *Plant Protection Science*. 40:63-74.
- Castro-Rocha, A., Fernández-Pavía, S.P., Osuna-Ávila, P. (2012). Chili defense mechanisms in the *Capsicum annuum-Phytophthora capsici* pathosystem. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30:49-65.
- Chemeltorti, P.P., Mutaquin, K.H., Widodo, W. (2017). Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: A synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil. *European Journal of Plant Pathology*. 147:157-166.
- Choi, D., Ward, B.B., Bostock, R.M. (1992). Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell*. 4:1333-1344.
- Chowdappa, P., Kumar, S.P.M., Lakshmi, M.J., Upreti, K.K.. (2013). Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 and *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*. 65:109-117.

- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 4951-4959.
- Darregue, Y., Edel-Herman, V., Steinberg, C. (2016). Fungal genes and metabolites associated with the biocontrol of soil-borne plant pathogenic fungi. *In: Fungal metabolites*. (Ed) Mérillon, J.M. y Ramawat, K.G. Ed Springer international Publishing. Switzerland. Pp. 33-104.
- Dell'Amico, E., Cavalca, L., Adreoni, V. (2008). Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. 40:74-84.
- Doyle, J.J., Doyle J.L. (1990). Isolation off plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Duijff, B.J., Pouhair, D., Olivain, C., Alabouvette, C., Lemanceau, P. (1998). Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*. 104:903-910.
- Egamberdieva, D., Li, L., Lindström, K., Räsänen, L.A. (2016). A synergistic interaction between salt-tolerant *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* strains improves growth and symbiotic performance of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) under salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100:2829-2841.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46:387-400.
- Ezziyyani, M., Pérez-Sánchez, C., Ahmed, A.S., Requena, M.E., Candela, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el control de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología*. 26:35-45.
- Fernández-Herrera, E., Rojas-Mártinez, R.I., Gómez-Rodríguez, O., Guevara-Olvera, L., Rivas-Dávila, M.E., Valdez-Moctezuma, E., Zavaleta-Mejía, E. (2012). Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en Chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici*. 37:370-376.
- Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., Zhang, Y. (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. *In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. (Ed) Siddiqui, Z.A. Ed Springer, Netherlands. Pp. 67-109.

- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausses, M.L., Courrier, S., Le Roux, Ch., Raijmakers, J., Martinnoti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165:317-328.
- Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausses, M.L., Courrier, S., Le Roux, Ch., Raijmakers, J., Martinnoti, M.G., Pierrat, J.C., Garbaye, J. (2005). Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165:317-328.
- Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S. Dunfield, K.E. (2013). Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*. 100:1738-1750.
- Gayoso, C., De Ilárduya, O.M., Pomar, F., De Cáceres, F.M. (2007). Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*. 118:199-209.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 6:1-13.
- Gou, Y., Zheng, H., Yang, Y., Wang, H. (2007). Characterization of *Pseudomonas corrugate* strain P94 Isolated from soil in Beijing as a Potential Biocontrol Agent. *Current Microbiology*. 55:247-253.
- Gou, Z.; Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., Li, C., Li, P. (2006). Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research*. 341:351-354pp.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EMBI. *Nucleic acids research*. 38:695-699.
- Guillén-Cruz, R., Hernández-Castillo, F.D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C.N., Padrón-Corral, E., Reyez-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*. 24:105-114.

- Hantsis-Zacharov, E., Halperin, M. (2007). Culturable psychotropic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:7162-7168.
- Hubbard, J.P., Harman, G.E., Hadar, Y. (1983). Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. On the biological control agent *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Ecology and Epidemiology*. 5:665-659.
- Ibarra-Medina, V.A., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Lara-Hernández, M.E., Valdez-Carrasco, J.M. 2010. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revista Mexicana de Micología*. 31:53-63.
- Jain, A., Singh, A., Singh, B.N., Singh, S., Upadhyay, R.S., Sarma, B.K., Singh, H.B. (2013). Biotic stress management in agricultural crops using microbial consortium. *In: Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. (Ed) Maheshwari, D.K. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 427-447.
- Jukes, T., Cantor, C. (1969). "Evolution of protein molecules". *In: Mammalian Protein Metabolism*. Ed: H. N. Munro. New York, N Y :Academic Press. Pp. 21–132.
- Jung, W.J., Jin, Y.L., Kim, Y.C., Kim, K.Y., Park, R.D., Kim, T.H. (2004). Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes and induction of the isoenzymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biological Control*. 30:645-652.
- Kefalogianni, I., Gkizi, D., Pappa, E., Dulaj, L., Tjamos, S.E., Chatzipavlidis, I. (2017). Combined use of biocontrol agents and zeolite as a management strategy against *Fusarium* and *Verticillium* wilt.
- Khare, E., Arora, N.K. (2010). Effect of indole-3-acetic acid (IAA) produced by *P. aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea. *Currents in Microbiology*. 61:64-68.
- Kim YJ, Hwang BK. (1994). Differential accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 45:195-209.
- Kim YJ, Hwang BK. (1996). Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuri chloride. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 48:417-432.

- Kim, B.S., Leem J.Y., Hwang B.K. (2000). *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Management Science*. 56:1029-1035.
- Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2013). *Trichoderma*: Genomic Aspects of Mycoparasitism and Biomass Degradation. *In: Genomics of Soil and Plant Associated Fungi*. (Eds) Horwitz, B.A. et al. Ed. Springer-Verlag Heidelberg. Pp. 127-156.
- Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J., Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*. 13:329-337.
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J.W. (2016). Volatile organic compound emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*. 3:1-14.
- Lee, Y.K., Hippe-Sanwald, S., Lee, S.C., Hohenberg, H., Hwang, B.K. (2000a). In situ localization of PR-1 mRNA and PR-1 protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Protoplasma* 211:64-75.
- Lee YK, Hippe-Sanwald S, Jung, HW, Hong JK, Hause, B, Hwang BK. (2000b). *In situ* localization of chitinase mRNA and protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57:111-121.
- Lorito, M., Woo, S.L. (2015). *Trichoderma*: A multi-purpose tool for integrated pest management. *In: Principles of plant-microbe interactions*. (Ed) Lugtenberg, B. Ed. Springer International Publishing Switzerland. Pp. 345-353.
- Louden, B.C., Haarmann, D., Lynne, A.M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*. 12:51-53.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R. (2017). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.04. <http://mesquiteproject.org>.
- Martínez-Noël, G.M.A., Madrid, E.A., Bottini, R., Lamattina, L. (2001). Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestance* interaction and inhibits the pathogen growth *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39:815-823.
- Meléndez-Monroy, M., Aranda-Ocampo, S., Carrillo-Castañeda, G., Hernández-Morales, J., Soto-Rojas, L. (2016). Rizobacterias nativas en jamaica antagonistas a *Phytophthora parasitica* Dastur: Aislamiento y caracterización. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 39:151-158.

- Mercado-Blanco, J. (2015). *Pseudomonas* strains that exert biocontrol of plant pathogens. *In: Pseudomonas*. (Ed) Ramos, J.L. *et al.* Ed Springer Netherlands. Pp. 121-172.
- Monaghan, J., Wihmann, T., Li, X. (2009). "Plant Innate Immunity". *In: Plant Environment Interactions, Signaling and Communication in plants*. Ed: Baluska. Springer-Verlag Berlin Heidenber. Pp. 119-136. DOI: 10.1007/978-3-540-89230-4\_7.
- Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. (2011). *Capsicum*. *In: Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Vegetables*. (Ed) Kole, C. Ed. Springer-Verlag. Berlin. Pp. 43-57.
- Mukherjee, P.K., Nautiyal, C.S., Mukhopadhyay, A.N. (2008). Molecular mechanisms of biocontrol by *Trichoderma* spp. *In: Molecular Mechanisms of Plant and Microbe coexistence*. (Ed) Nautiyal, C.S. y Dion, P. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 243-261.
- Muthukumar A., Eswaran, A., Sangetha, G. (2011). Induction of systemic resistance by mixtures of fungal and endophytic bacterial isolates against *Pythium aphanidermatum*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33:1933-1944.
- Oh, S.K., Baek, K.H., Park, J.M., Yi, S.Y., Yu, S.H., Kamoun, S., Choi, D. (2008). *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist*. 177:977-989.
- Ozgonen H., Erkilic, A. (2007). Growth enhancement and Phytophthora blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal funga inoculation in pepper. *Crop Protection*. 26:1682-1688.
- Padney, S.P., Smossich, I.E. (2009). The role of wrky transcription factors in plant immunity. *Plant pathology*. 150:1648-1655.
- Panwar, M., Twari, R., Nayyar, H. (2014). Microbial consortium of plant growth promoting rhizobacteria improves the performas of plants growing in stressed soils: an overview. *In: Phosphate solubilizing microorganisms*. (Ed) Khan M.S. *et al.* Ed. Springer international publishing Switzerland. Pp. 257-285.
- Park, C.J., Shin, Y.C., Lee, B.J., Kim, K.J., Kim, J.K., Peak, K.H. (2006). A hot pepper gene encoding WRKY transcription factors during hypersensitive response to *Tobacco mosai virus* and *Xanthomonas campestris*. *Planta*. 223:168-179.

- Park, J.W., K. Balaraju, J.W. Kim, S.W. Le y K. Park, K. (2013). Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07. *Biological Control*. 65:246-257.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*. 9:534-540
- Pastor, N., Masciarelli, O., Fisher, S., Luna, V., Rovera, M. (2016). Potential of *Pseudomonas putida* PCI2 for the protection of tomato plants against fungal pathogens. *Current Microbiology*. 73:346-353.
- Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. (2013). Biocontrol of plant pathogens using plant growth promoting bacteria. *In: Sustainable Agriculture Reviews*. (Ed.) E. Lichtfouse. Ed. Springer Science + Business Media Dordrecht. India. Pp. 319-360.
- Ramos-Sandoval, R.U., Gutiérrez.-Soto, J.G., Rodríguez-Guerra, R., Salcedo-Martínez, S.M., Hernández-Luna, C.E., Luna-Olvera, H.A., Jiménez-Bermont, J.F., Fraire-Velázquez, S., Almeyda-León, I.H (2010). Antagonismo de dos ascomicetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28:75-86.
- Rushton, P.J., Somssich, I.E., Ringler, P., Shen, Q.J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*. 15:247-258.
- Sacherer, P., Défago, G., Haas, D. (1994). Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS Microbiology Letters*. 116:155-160.
- Sarma, B.K., Yadav, S.K., Singh, S., Singh, H.B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil biology and biochemistry*. 87:25-33.
- Sayyed, R.Z., Chincholkar, S.B., Reddy, M.S., Gandrude, N.S., Patel, P.R. (2013). Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. *In: Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. (Ed) Maheshwari D.K. Ed Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp. 449-471.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 3:1101-1108.
- Sharma, P.K., Gothwal, R. (2017). *Trichoderma*: A potent fungus as biological control agent. *In: Agro-Environmental Sustainability*. (Eds) Singh, J.S., and Senevirante, G. Ed. Springer International Publishing AG. Pp. 113-125.

- Shen, Q.H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ülker, B., Somssich, E., Schulze-Lefert, P., (2007). Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science*. 315:1098:1103.
- Shen, S.S., Piao, F.Z., Lee, B.W., Park, C.S. (2007). Characterization of antibiotic substance produced by *Serratia plymuthica* A21-4 and the biological control activity against pepper phytophthora blight. *Plant Pathology Journal*. 23:180-186.
- Sheoran, N., Nadakkakath, A.V., Munjal, V., Kundu, A., Subaharan, K., Vnugopal, V., Rajamma, S., Eapen, S.J., Kumar, A. (2015). Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological Research*. 173:66-78.
- SIAP. (2010). Un panorama del cultivo del chile. SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>. Consultado el 8 de Marzo, 2013.
- Subba Rao, N.S. 1992. Biofertilizers in agriculture. Oxford IBH. Publishing. New Delhi, India.
- Sumaya, K., Yamamoto, H., Nagana Wa, T., Iwata, T., Komada, H. (1993). A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by congo red staining. *Soil Science and Plant Nutrition*. 39:361-365.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.
- Tarkka, M.T., Frey-Klett, P. (2008). Mycorrhiza helper bacteria. *In: Mycorrhiza*. (Ed) Varma, A. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 113-132.
- Tasic, S., Kojic, M., Obradovic, D., Golubovic, Z., Tasic, I. (2014). Molecular and biochemical characterization of *Pseudomonas putida* isolated from bottled uncarbonated mineral drinking water. *Archives of Biological Science*. 66:23-28.
- Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M.S. (2008). *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*. 163:329-336.
- Ueda, M., Kubota, M., Nishi, K. (2006). Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 67:149-154.

- Untergasser A., Cutchutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G. (2012). Primer 3 – New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40:e115.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:137-144.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R.I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A.M., Zavaleta-Mejía, E. (2009). Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobus aberrans*. *Nematropica*. 39:143-155.
- Viruel, E., Erazzú, L.E., Martínez-Calsina, L., Ferrero, M.A., Lucca, M.E., Siñeriz, F. (2014). Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 14:819-831.
- Wang, D., Amornsiripinit, N., Dong, Z. (2006). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens*. 2:1042:1050.
- Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52:487-511.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., Brinkman, F.S. (2015). Enhanced annotations and features for comparing thousand of *Pseudomonas* genomes in the Pseudomonas genomes database. *Nucleic Acid Research*. 44:646-653.
- Wollum, A.G. (1982). "Cultural methods for soil microorganisms". *In: Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and Microbiological Properties-Agronomy Monograph no. 9*. Ed: A.L. Madison, WI. Soil Science of America, Inc. Publisher. Pp. 781-802.
- Yi, S.Y., Lee, D.J., Yeom, S.I., Yoon, J., Kim, Y.H., Kwon, S.Y., Choi, D. (2010). A novel pepper (*Capsicum annuum*) receptor-like kinase functions as a negative regulator of plant cell death via accumulation of superoxide anions. *New Phytol*. 185:701-705.

Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M.P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., Lozoya-Gloria, E. (2000). Isolation of an elicitor stimulated 5-epi aristolochene synthase gene (gPEAS1) from chili pepper (*Capsicum annuum*) *Physiologia Plantarum*. 110:410-418.

Zheng, L.R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q., Nahm, B.H., Leung, H., Wang, G.L. (2004). Spotted leaf 1, a negative regulator of plant cell death and defense, encodes a U-Box/armadillo repeat protein endowed with E3 ubiquitine ligase activity. *Plant Cell*. 16:2795-2808.