

**RIZOBACTERIAS Y SU EFECTO EN EL
DESARROLLO Y RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE
CHILE (*Capsicum annum* L.) EN UN SUELO
INFESTADO CON *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y
Phytophthora capsici EN DOLORES HIDALGO,
GUANAJUATO, MÉXICO.**

RAQUEL GUILLÉN CRUZ

T E S I S

**Presentada como requisito parcial
para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en
Parasitología Agrícola**



**Universidad Autónoma Agraria Antonio
Narro
PROGRAMA DE GRADUADOS
Buenavista, Saltillo, Coahuila
Septiembre de 2005**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**RIZOBACTERIAS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO Y RENDIMIENTO DEL
CULTIVO DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) EN UN SUELO INFESTADO CON
Fusarium spp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* EN DOLORES HIDALGO,
GUANAJUATO, MÉXICO.**

TESIS

POR

RAQUEL GUILLEN CRUZ

**Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para optar al grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGIA AGRÍCOLA**

COMITE PARTICULAR

Asesor principal:

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor:

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor:

Dr. Raúl Rodríguez Herrera

Asesor:

MC. Emilio Padrón Corral

**Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Postgrado**

Buenavista, Saltillo, Coahuila. Septiembre de 2005

COMPENDIO

RIZOBACTERIAS Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO Y RENDIMIENTO DEL CULTIVO DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) EN UN SUELO INFESTADO CON *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* EN DOLORES HIDALGO, GUANAJUATO, MÉXICO.

POR

RAQUEL GUILLÉN CRUZ

MAESTRIA

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. SEPTIEMBRE 2005.

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo – Asesor –

Palabras clave: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, **Biocontrol, rRNA 16S, Secuenciación.**

Los objetivos de esta investigación fueron conocer el potencial en campo de cuatro aislados de *Bacillus* y la mezcla de estos (B1, B3, B9 y B13), en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile, así como, el biocontrol de la pudrición de raíz e identificar las especies de dichos aislamientos. La aplicación de los *Bacillus* aumentó el desarrollo en las plantas y el rendimiento al final del cultivo. Por otro lado, se redujo la incidencia y severidad de pudrición de raíz respecto al tratamiento tradicional y al

testigo. La identificación bacteriana se realizó por pruebas bioquímicas y placas Biolog; así como, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores oligonucleotidos específicos para el gen ribosomal 16S. Se realizó la amplificación y purificación de un fragmento de ADN de las bacterias para su secuenciación y se compararon con las secuencias existentes en bancos de genes para verificar que correspondieran a las especies identificadas por pruebas bioquímicas y Biolog. El aislado de *Bacillus* B1 se identificó como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus* B3 se identificó como *Bacillus licheniformis* y *Bacillus* B9 y B13 como *Bacillus subtilis*. En un árbol filogenético estos *Bacillus* fueron agrupados por separado con otros aislamientos de *Bacillus*.

ABSTRACT

RIZOBACTERIAS AND THEIR EFFECT IN THE DEVELOPMENT AND HUMILITY OF CULTIVATE OF PEPPER (*Capsicum annuum* L.) IN INFESTED SOIL WHIT *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici* IN DOLORES HIDALGO, GUANAJUATO, MEXICO.

BY

RAQUEL GUILLÉN CRUZ

MASTER IN SCIENCE

AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. SEPTEMBER 2005.

Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo – Adviser -

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, **Biocontrol, rRNA 16S, Secuenciación.**

The objectives of this research were; to know the potential in field of four isolated of *Bacillus* and the mixture of these (B1, B3, B9 B13), in the development and yield of the cultivation of pepper, as well as, the biocontrol in root-rot and identify the species of statements isolations. The application of the *Bacillus* increased the development in the plants and the yield at the end of the cultivation. On the other hand, it decreased the incidence and severity of root-rot concerning the traditional treatment

and to the witness. The bacterial identification was carried out for biochemical tests and Biolog badges; as well as, for the reaction in chain of the polimerase (PCR) with specific primers for the ribosomal gene 16S. It was carried out the amplification and purification of a fragment of ADN of the bacterias for their sequences and they were compared with the existent in banks of genes in order to verify that they correspond to the species identified by biochemical tests and Biolog. The isolated of *Bacillus* B1 identified like *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus* B3 identified *Bacillus licheniformis* and *Bacillus* B9 and *Bacillus* B13 like *Bacillus subtilis*. In a phylogenetic tree these *Bacillus* was contained for separating with other isolations of *Bacillus*.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del chile (*Capsicum annumm* L.) es el quinto cultivo hortícola a nivel mundial, en cuanto a superficie cultivada y el tercero en cuanto a producción total (SAGARPA, 2002). En América el país con mayor superficie de este cultivo es México con la producción de chile anchos, jalapeños y serranos, los cuales representan del 70 al 80 por ciento de la producción nacional (Nuez *et al.*, 1996).

Los principales estados productores de chile en México son: Sinaloa, Chihuahua, Guanajuato, Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí y Sonora. Entidades que concentran más del 50 por ciento de la superficie sembrada y cosechada, así como el 60 por ciento de la producción. La importancia económica de este cultivo es evidente por su amplia distribución y consumo (Claridades Agropecuarias, 1998).

Dentro de las limitantes del sistema de producción del cultivo de chile, son las ocasionadas por numerosas enfermedades fungosas que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo, llegando a causar cuantiosas pérdidas lo que ha originado que muchas regiones productoras hayan disminuido la superficie de siembra, desafortunadamente las alternativas de control tanto de plagas como de enfermedades son pocas (Guigón *et al.*, 2001).

Uno de los principales problemas fitosanitarios, lo constituye el marchitamiento causado por *Phytophthora capsici*. Este patógeno puede producir pérdidas del 40 al 60 por ciento y en algunas áreas de la región la pérdida total del cultivo (Virgen *et al.*, 1997). Este patógeno se ha señalado como el único agente causal de la marchitez o pudrición de raíz de las plantas de Chile. Sin embargo, algunos estudios preliminares y observaciones de campo indican que otros fitopatógenos aislados de raíces enfermas de plantas de Chile, pudieran estar involucrados en la enfermedad. Los patógenos asociados a las raíces de Chile con mayor frecuencia ocasionando el complejo de la marchitez o secadera son: *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp., presentándose como complejo o individualmente en la mayoría de las regiones donde se cultiva esta hortaliza (Velásquez *et al.*, 2001).

El control principal de estos fitopatógenos se realiza con la aplicación de agroquímicos, sin embargo, el uso de estos productos ha originado diversos problemas debido al impacto ambiental que ocasiona, consecuencias como toxicidad al hombre, resistencia de ciertos patógenos, además, incrementar los costos del cultivo. Ante esta situación se han llevado a cabo algunos trabajos de investigación con la finalidad de establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental y que permitan reducir el uso de plaguicidas y lograr un manejo integrado del problema fitosanitario buscando que este sea eficiente, y de bajo costo económico y ambiental (Pérez *et al.*, 2004).

Una alternativa favorable para disminuir la contaminación ocasionada por el uso de productos químicos en el manejo de fitopatógenos, es la utilización de

microorganismos antagónicos, como las bacterias del género *Bacillus* que son consideradas las más eficaces por sus propiedades de inhibición de fitopatógenos de raíces así como en la promoción del crecimiento de las plantas, induciendo teóricamente mayor producción a corto plazo. Dada la gran diversidad y las potencialidades tanto en el suelo como en la rizósfera, se considera a este microorganismo como un colonizador eficaz. Por tal motivo, el uso de rizobacterias para el control biológico provee una herramienta potencial en el control de fitopatógenos (Virgen *et al.*, 1997).

En México son pocas las investigaciones que se han realizados sobre control biológico de fitopatógenos mediante el uso de microorganismos antagonistas. La mayoría se han realizado en laboratorio o invernadero y muy pocas en campo. Es evidente la necesidad de intensificar la investigación en el control de fitopatógenos y de dar continuidad a las investigaciones realizadas en laboratorio e invernadero para determinar su potencial en campo. De esta manera se podrá contribuir a reducir tanto la contaminación ambiental como la presión de selección que se ha ejercido sobre las poblaciones de fitopatógenos (Virgen *et al.*, 1997).

Es importante mencionar que dentro de los métodos que actualmente se utilizan para la identificación de bacterias antagónicas además de los basados en pruebas bioquímicas y el sistema en placas Biolog, se encuentra actualmente la técnica de PCR (Ayala, 2002).

Por ello, considerando que una de las principales enfermedades del chile en condiciones de campo es el complejo de pudrición de raíz (*Phytophthora capsici*,

Rhizoctonia solani, y *Fusarium* spp.) y considerando la posibilidad de controlar esta enfermedad mediante alternativas de control biológico, en el presente trabajo se contemplan los siguientes objetivos.

Objetivo General

Evaluar la efectividad de *Bacillus* spp., como inoculante biológico y biocontrol en enfermedades de suelo en el cultivo de chile en condiciones de campo.

Objetivos Particulares

1. Identificación a nivel especie los aislados de *Bacillus* spp., mediante pruebas bioquímicas y moleculares.
2. Determinar la eficiencia antagónica de los aislados en incidencia y severidad de la enfermedad causada por el complejo de la marchitez de chile (*Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, y *Fusarium* spp.) en condiciones de campo.
3. Determinar efecto en desarrollo y rendimiento del producto cosechado.

REVISIÓN DE LITERATURA

El Cultivo de Chile y su Importancia en Guanajuato, México.

En México se siembran 512,000 ha con hortalizas, lo que equivale en porcentaje a un 3.5 de la superficie agrícola nacional; de dicha superficie 15 y 7 por ciento se dedica a chile verde (*Capsicum annuum* L.) y chile seco respectivamente. El chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes en nuestro país y el de mayor consumo popular, especialmente en el estado fresco, aunque también se consume procesado en forma de salsas, polvo y encurtidos. De las 49 especies hortícolas que se producen a nivel comercial en México, el 57 por ciento se concentra en los estados de Sinaloa, Guanajuato, Sonora, Querétaro, Estado de México, Baja California, Jalisco y Morelos (Pérez *et al.*, 2005).

Del total de la superficie cultivada con chile en el país, en el Estado de Guanajuato se siembran aproximadamente 15,000 ha del tipo ancho, que representan entre el 19 y 21 por ciento del total. Para el norte del estado de Guanajuato la producción de estos tipos de chile tiene gran importancia, contribuyendo aproximadamente con el 60 por ciento de la producción nacional. La zona productora de chile del norte de Guanajuato se encuentra localizada en orden de importancia, en los municipios de Dolores Hidalgo, San Luis de la Paz y San Felipe y en menor importancia, San Diego de

la Unión, Dr. Mora y San Miguel de Allende. Los municipios de mayor importancia han alcanzado rendimientos promedio de 10 toneladas por ha en chile verde y 1.5 toneladas por ha en chile seco, rendimientos superiores hasta en un 25 por ciento a la media nacional, convirtiéndose como consecuencia en la región abastecedora más importante del mercado nacional. En el aspecto socioeconómico, este cultivo tiene una gran importancia por la cantidad de mano de obra que se genera en el medio rural, requiriéndose 160 jornales por hectárea por año (Pérez *et al.*, 2005).

Clasificación y Descripción Botánica del Chile Ancho

Todas las formas de pimiento, chile o ají utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. El nombre científico del género deriva del griego: según unos autores de *kapso* (picar), según otros de *kapsakes* (cápsula). Este género se incluye en la extensa familia de las Solanáceas (Nuez *et al.*, 1996).

La clasificación taxonómica del chile es la siguiente:

División.....Angiospermae

Clase.....Dicotyledonae

Orden.....Tubiflorae

Familia.....Solanaceae

Género.....*Capsicum*

Especie.....*annuum*

La planta tiene una altura de 60 a 80 cm, con follaje vigoroso y cerrado, cuyo diámetro es de 90 cm; presenta ramas de 40 cm de longitud y la primera ramificación se encuentra de 8 a 12 cm de la base del tallo; ello evita que los frutos estén en contacto con el suelo. Los frutos son colgantes, cilíndricos y de ápice agudo; el pedúnculo es de 6 cm; presenta 2 lóculos. Su pugnencia (picor) es moderada, con variaciones. El color del fruto es verde esmeralda a verde oscuro y al madurar cambia a rojo. Se siembra en surcos de 1.50 m a 2.0 m en doble hilera, de 25 cm a 40 cm entre planta y planta. Es un cultivo que se tiene de 100 a 180 días hasta la cosecha dependiendo del clima, agua y temperatura. Se siembra en almácigos o en invernaderos y de ahí se transplanta (Nuez *et al.*, 1996).

Daños Causados por Enfermedades

El daño causado por enfermedades en las plantas se observa a simple vista y es consecuencia del desarrollo de microorganismos dentro de ellas. Los patógenos (microorganismos dañinos) consumen de la planta sus alimentos y producen sustancias tóxicas que interfieren en su funcionamiento, llegando a ser crónica o letal. Entre los fitopatógenos más importantes de este cultivo, sin duda, destacan aquellos relacionados a la marchitez del chile, este síntoma se ha asociado a fitopatógenos tales como *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp., o bien, por la acción de estos como un complejo (Productores de Hortalizas, 2004).

Marchitez de Chile Causada por *Phytophthora capsici*

P. capsici, tiene una amplia distribución geográfica y constituye una de las principales enfermedades de la mayoría de las áreas productoras de Chile, especialmente en zonas de riego. Puede provocar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. La podredumbre del cuello y la subsiguiente marchitez brusca son los síntomas más característicos. Ocasiona daños hasta en 80 por ciento en las zonas productoras de Chile y en México se calcula que aproximadamente el 40 por ciento de las plantas mueren por esta enfermedad (Mendoza, 1999).

Etiología

P. capsici es una especie heterotálica (presenta micelio liso) que forma esporangióforos simples o con ramificación irregular, esporangios deciduos de forma variable (alargados, ovoides, elíptica, globosos, alimonados) con una o dos papilas bien desarrolladas en cuyo interior se diferencian varias esporas biflageladas o zoosporas; oogonios esféricos a subesférico con pared lisa; anteridios claviformes, anfígenos o diclinos; oosporas con pared gruesa, lisas o appleróticas; las oosporas o esporas de origen sexual son esféricas o subesféricas, también forma clamidosporas o esporas de resistencia a las condiciones adversas (Messiaen *et al.*, 1995).

Síntomas

Los síntomas característicos comienzan con una marchitez muy leve de la planta y después de 3 ó 4 días, se marchita completamente, observándose en el cuello un necrosamiento muy marcado y al efectuarse un corte se nota una coloración café oscura. Las plantas enfermas muestran una banda parda oscura que ciñe el cuello de la raíz, debido a lo cual se marchitan y mueren. En las hojas y en las ramas también se presentan lesiones como tizón. Los frutos afectados permanecen adheridos a la planta a un cuando en ellos se forman manchas acuosas cubiertas por el micelio del patógeno. La semilla de estos frutos también es afectada y frecuentemente al abrirlos, se observa micelio de color oscuro que cubre las semillas podridas. En plántulas, puede causar “damping-off” y después pudrición del tallo. Esta especie ocasiona el mayor daño cuando afecta las raíces y tallo, generalmente en la época de floración, donde la planta rápidamente se marchita y se seca (Mendoza, 1999).

P. capsici puede provocar daños en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. La podredumbre del cuello y la subsiguiente marchitez brusca son los síntomas más característicos. En el cuello de la planta enferma puede observarse una zona anular deprimida de color negruzco, que afecta primero a los tejidos corticales y posteriormente a los vasculares. Esta lesión se desarrolla tanto en sentido ascendente como descendente, a partir del punto de infección, y termina produciendo la asfixia de la planta. Este fenómeno se produce de una forma tan rápida que las hojas se muestran colgantes, pero conservando inicialmente su color verde. Infecciones a partir de puntos más altos en la planta, también han sido señaladas, en estos casos se suelen producir por

salpicaduras de gotas de agua portadoras de las típicas zoosporas que pueden germinar sobre tallos, hojas y frutos, en éstos a través de la inserción peduncular o de heridas. Los ataques aéreos también pueden ser provocados por corrientes de aire, necesariamente muy húmedo, para asegurar la supervivencia de las zoosporas hasta alcanzar las plantas (Mendoza, 1999).

Ciclo de la Enfermedad

Las oosporas son la única fuente de inóculo primario y sobrevive en el suelo por más de dos años en ausencia del hospedante. El micelio, es una fuente importante de inóculo secundario. Las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad son: la alta humedad del suelo y temperaturas frescas, en la última etapa del cultivo éste es más afectado porque coincide con la época más lluviosa. La enfermedad incide generalmente después del transplante o cuando las lluvias y el mal drenaje permiten su desarrollo. Las infecciones en el cuello de la planta se deben a las zoosporas del hongo que son llevadas por el agua e inician la infección por las heridas o los estomas. El marchitamiento se debe a una secreción de toxinas del patógeno y al taponamiento de los vasos conductores. Las lesiones de las ramas y las hojas son provocadas por el salpique del agua de lluvia. Este patógeno sobrevive de una estación a otra en los residuos de la cosecha, los esporangios se forman en la base del tallo, los cuales liberan zoosporas que son acarreadas por el agua a otras plantas. El inóculo queda como oosporas en residuos de cosecha, en las semillas atacadas o en el suelo como micelio u oosporas, que al ciclo siguiente germinan e infectan de nuevo a las plantas (Messiaen *et al.*, 1995).

Marchitez de Chile Causada por *Rhizoctonia solani*

R. solani, es uno de los agentes causales que junto con otros patógenos se relacionan ocasionando enfermedades en los semilleros o almácigos. Cuando plantas parcialmente infectadas se utilizan para el transplante, debido al estrés sufrido en esa operación, los síntomas se ponen en evidencia en la parcela de cultivo. Esta enfermedad se confunde comúnmente con la marchitez causada por *P. capsici* debido a la similitud en síntomas y, por tanto, su distribución e importancia no está bien definida; sin embargo, se ha identificado en Morelos, Estado de México y Guanajuato. Las pérdidas que ocasiona esta especie van desde el 20 al 50 por ciento de plantas muertas, a esta pérdida se debe agregar los gastos por replante, diferencias en maduración y reducciones en rendimiento (Nuez *et al.*, 1996).

Etiología

Este patógeno no produce conidias, el micelio es incoloro cuando es joven y cafoso cuando envejece; es característica su ramificación en ángulo de 90° y las constricciones muy marcadas en las septas; la ramificación se origina subterminalmente en donde termina la septa; desarrolla esclerocios cafosuscos a negros de forma variable y frecuentemente pequeños. *R. solani* se encuentra dividida en grupos basados en la anastomosis hifal (Romero, 1993).

Síntomas

En condiciones favorables ataca plántulas antes de que emerjan o poco después de la emergencia. Las lesiones son hundidas y de tamaño variable, con coloraciones café canela o café rojizo. Las áreas oscuras y necróticas son más evidentes cuando el tejido atacado es grande; si las condiciones son favorables, las lesiones se extienden y adquieren un aspecto hundido que puede llegar a cubrir toda la base del tallo y destruir raíces debilitando la planta o causándole un acentuado amarillamiento. En plantas de más de 15 cm de altura ocasiona marchitez, en las raíces se observan áreas necróticas que varían en tamaño de acuerdo al desarrollo de la enfermedad. Las partes aéreas se aprecian con clorosis, marchitez y por último sobreviene la muerte. Los síntomas en la parte aérea son más notorios después de la floración (marchitez y muerte de la planta), en el cuello provoca una pudrición no compacta, por lo que se desprende fácilmente la epidermis (Agrios, 1998).

Ciclo de la Enfermedad

Las condiciones que favorecen la incidencia de la enfermedad son, exceso de humedad en el suelo y temperatura alrededor de 15 °C o mayores. Este hongo produce estructuras de resistencia llamados esclerocios, dichas estructuras se producen al inicio de las lluvias. En las plantas, se puede observar el micelio como filamentosos de color café o ámbar a la altura del cuello de la raíz. Esto lo diferencia de *Fusarium*; ya que en éste se pueden observar estriaciones de color rosado en la raíz debido a que la epidermis se agrieta y se forman los conidios; *Rhizoctonia* sobrevive también en residuos de

cosecha y se disemina en la semilla. Los esclerocios germinan entre 8-30 °C, aunque la temperatura óptima es de 21 a 25 °C (Pernezny *et al.*, 2003).

Marchitez del Chile Causada por *Fusarium* spp.

Una de las enfermedades del chile es la marchitez producida por este hongo. Diversos estudios han mostrado que *Fusarium oxysporum* puede interactuar con *P. capsici* para producir la marchitez (Velásquez, 2001). La enfermedad se presenta al poco tiempo del transplante del chile y su ataque puede seguir hasta cuando la planta está en fructificación. Las pérdidas causadas pueden alcanzar hasta un 86 por ciento y se encuentra presente en muchas áreas productoras del país reportándose en los estados de Sinaloa, Tamaulipas, Durango, Jalisco, Veracruz, Guanajuato y Chiapas (Velásquez *et al.*, 2004).

Etiología

En medios sólidos como papa dextrosa agar (PDA), las diversas formas de *Fusarium* pueden variar; en general, el micelio primero aparece blanco y puede cambiar a una variedad de colores extendiéndose de violeta al púrpura oscura de acuerdo a la forma especial del hongo. Si los esporodocios son abundantes, el cultivo puede aparecer en color crema o naranja. *Fusarium* produce tres tipos de esporas asexuales: microconidios, macroconidios y clamidosporas; los cuales son organismos unicelulares o bicelulares y son el tipo de esporas más abundante y frecuentemente producidas por el hongo a cualquier condición. Los macroconidios están formados por tres a cinco células,

gradualmente puntiaguda y curvada al final. Las clamidosporas son redondas, de pared celular gruesa, es formada en las terminales o intercalada sobre el micelio o en los macroconidios (Agrios, 1998). Los conidios se desarrollan sobre las hifas en conidióforos cortos que son ramificados y se encuentran en un esporodoquio. Los microconidios tienen forma oblonga u ovoide, simples o en cadenas; los macroconidios son curvados, con terminaciones más o menos punteadas, terminación basal con un pie definido. La morfología es semejante en la gran mayoría de las especies, sin embargo, no todas producen clamidosporas (Smith *et al.*, 1988).

Síntomas

Fusarium causa diversos síntomas en las plantas de Chile, como pudrición seca de raíces, marchitamientos y decoloración de las hojas. Las plantas son afectadas en todos los estados del desarrollo, incluso la semilla recién germinada en el suelo puede presentar pudrición. La fuente de inóculo se encuentra en el suelo penetrando las raíces jóvenes o por las heridas producidas en las raíces adultas, crece en los tejidos radicales externos hasta llegar al tejido vascular en forma axial, produciendo micelio que luego invade las raíces. Produce síntomas iniciales como encarrujamiento y decoloración de las hojas, el patógeno causa una destrucción de las raíces provocando un desprendimiento fácil de la planta (Pernezny *et al.*, 2003).

Los síntomas de la marchitez por *Fusarium* varían dependiendo de los factores ambientales, la edad de la planta infectada, la agresividad y la densidad de la población del patógeno. Las plantas se observan normales por la mañana, pero en el transcurso del

día se marchitan, repitiéndose esta secuencia hasta que las plantas mueren. Inicialmente solo una parte de la planta puede mostrar síntomas, pero eventualmente la planta completa es afectada. La marchitez ocurre más rápidamente cuando la planta está bajo estrés. Este patógeno se encuentra ampliamente diseminado y es sin duda una de las enfermedades más importantes en el cultivo, mostrando amarillamiento generalizado de la planta seguido del marchitamiento de la misma, aunque en algunos de los casos la planta se puede marchitar sin mostrar amarillamiento, y a pesar de que el tejido esté muerto, el patógeno frecuentemente crece sobre la superficie externa de la planta, produciendo una masa micelial blanca con abundantes macroconidios (Martyn y Gordon, 1996).

Ciclo de la Enfermedad

Fusarium es un patógeno abundante y activo en el suelo y materia orgánica. Su capacidad saprofita le permite sobrevivir en el suelo hasta por 20 años, o entre los ciclos de siembra infectando los restos de plantas. El hongo puede sobrevivir como micelio o como cualesquiera de sus tres diversos tipos de la espora (Smith *et al.* 1988).

El género *Fusarium* está caracterizado en su ciclo de vida por diferentes fases, las cuales incluyen:

- 1) Fase I (fase determinativa primaria), caracterizada por el éxito o la falla del patógeno en penetrar el tejido externo del hospedero.
- 2) Fase II (fase determinativa secundaria), la cual consiste en el éxito o falla en la colonización del sistema vascular del hospedero.

- 3) Fase expresiva, en la cual ocurre desarrollo de síntomas en el hospedero por el patógeno.
- 4) Sentencia o muerte del tejido hospedero por el patógeno. Esto sucede debido al crecimiento del hongo dentro del tejido vascular de la planta, produciendo marchitez de las hojas y eventualmente la muerte de la planta.
- 5) Producción de estructuras de resistencia por el patógeno. Las clamidosporas son rápidamente formadas e incorporadas dentro del suelo y sirve como propágulo para su siguiente diseminación.
- 6) Liberación de estructuras en el suelo. Una vez que la superficie del tejido muerto es abundantemente esporulada, estas esporas pueden ser usadas como nuevo inóculo para otra propagación del hongo.
- 7) Renovación de las estructuras de resistencia por crecimiento saprofítico, esto se da sobre restos orgánicos y exudados de raíces.
- 8) Renovación por estructuras de resistencia por infecciones ocasionadas en raíces de hospederos y no hospederos (Virgen, 1998).

Métodos de Control de la Marchitez de Chile

Algunos métodos de control ayudan a erradicar o a reducir la cantidad de inóculo de los patógenos presentes en un área, una planta o en las semillas. Muchos de estos métodos son del manejo del cultivo, es decir, dependen principalmente de ciertas actividades del agricultor, como la erradicación del hospedante, la rotación de cultivos, saneamiento, mejoramiento de las condiciones de crecimiento de las plantas, la formación de condiciones desfavorables para los patógenos, acolchado con polietileno,

riego por goteo y labranza mínima de la tierra entre otros. Dentro de los principales métodos de control se encuentra el control genético, cultural, químico y biológico (Agrios, 1998).

Control Genético

Es el que se basa en la tolerancia o resistencia genética de las plantas aplicados a la agricultura, por lo tanto, es oportuno y estratégico la formación de materiales genéticos que presenten niveles de producción cercanos a los híbridos, y que sean costeables por el bajo costo de semilla, rendimiento y calidad de fruto, así como por la tolerancia a enfermedades (Acosta y Luján, 2004). En este sentido, existen líneas mejoradas de chile ancho tales como: Criollo Calera, LEAZ-6 (Ancho Zacatecas), LEAZ-8, LEAZ-10 y Ancho San Luis con producciones similares a los materiales que actualmente se utilizan en algunos estados como Aguascalientes, Guanajuato, Zacatecas y San Luis Potosí, por lo que se consideran prometedores para aumentar la producción a nivel regional (Macias *et al.*, 2005).

Control Cultural

Es aquel en que las prácticas normales de un cultivo pueden ser utilizadas para reducir la incidencia de una enfermedad, y estas pueden ser muy variadas, las más usadas por su eficacia son la rotación de cultivos, creación desfavorable para los patógenos con el uso de microorganismos antagónicos, trampas amarillas, feromonas, etc., para monitoreo y control de insectos vectores de enfermedades, acolchado con

polietileno, aplicaciones de residuos de cosechas, modificadores orgánicos, evitar encharcamientos de agua, hacer surcos altos y con alta pendiente, eliminar plantas enfermas, entre otros (Agrios, 1998; Perez *et al.*, 2004).

Control Químico

Esta basado en la aplicación de agroquímicos para el control de enfermedades, es decir, dependen del uso y la acción de una sustancia química que reduce la cantidad de inóculo del patógeno, por lo que comúnmente se utiliza el término funguicida para referirse a los productos químicos que controlan las enfermedades de las plantas. Este método de control se utiliza por lo general para proteger directamente la superficie de las plantas de la infección, o bien, para erradicar un patógeno que ya ha infectado a la planta. Sin embargo, algunos tratamientos químicos tienen como objetivo reducir la cantidad de inóculo antes de que este último entre en contacto con la planta. Dichos tratamientos incluyen tratamientos de suelo como la fumigación, desinfección de almacenes y el control de los insectos vectores de los patógenos. Entre los productos químicos que actualmente se utilizan en la región se encuentran azoxystrobin, metalaxyl, propamocarb clorhidrato y β -tiocianometiltiobenzotiasol a 2.0, 2.5, 2.75 y 4.0 g.i.a / lt; los productos químicos más utilizados (Perez *et al.*, 2004). El control químico es un método con grandes limitaciones debido al impacto que ocasiona, y que en la mayoría de los casos resulta poco efectivo, ya que el hongo habita en el suelo, el cual constituye una barrera física entre el hongo y los funguicidas (Agrios, 1998). Además, representa un riesgo potencial para el control de la pudrición de raíz en el estado de Guanajuato debido

a la variabilidad de los aislamientos de patógenos involucrados en la enfermedad (Perez *et al.*, 2004).

Control Biológico

El control biológico de los patógenos de las plantas es un área de investigación relativamente nueva, y promete ser una de las formas aceptables en el control de las enfermedades de las plantas, debido al poco desequilibrio ecológico que ocasiona y a la amplia posibilidad de usarse en programas de manejo integrado. El control biológico se define como la reducción del inóculo del patógeno, o de su capacidad de producir enfermedad mediante la acción de uno o más organismos excluyendo al hombre (Zavaleta, 1994).

El control biológico se basa en el uso de microorganismo que pueden ser antagonicos, parásitos o que producen antibiosis sobre el patógeno; y es una de las formas más aceptables en el control de enfermedades de las plantas. Dentro de los microorganismos que tienen potencial para usarse como agentes de control biológico de patógenos en la rizósfera se encuentran principalmente las rizobacterias, dado que constituyen la línea frontal de defensa entre fitopatógenos nativos del suelo y las raíces de las plantas, siendo candidatos ideales de usarse en la reducción de enfermedades. Frecuentemente, se asocia la promoción del crecimiento de las plantas por rizobacterias (PGPR) con el control biológico, ya que, son también capaces de proteger a las plantas contra el ataque de fitopatógenos (Jiménez *et al.*, 2001).

Entre las principales causas de la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas destacan la preocupación de los riesgos al medio ambiente y al hombre por exposición a plaguicidas, contaminación de los mantos freáticos por lixiviaciones de agroquímicos aplicados al suelo, pérdida de control químico sobre ciertos patógenos (generación de resistencia) y las limitaciones económicas sobre la aplicación de químicos costosos en áreas agrícolas con cosechas de poco valor remunerativo (Kloepeper, 1989).

Mecanismos de Control Biológico

Las bacterias se consideran como los habitantes del suelo más comunes, posiblemente por su rápido crecimiento y reproducción, así como, por su capacidad para utilizar un amplio rango de sustancias como fuente de carbono o nitrógeno; existen también aquellas que promueven el desarrollo de las plantas y son llamadas “Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas” (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR por sus siglas en inglés). Frecuentemente una cepa de PGPR puede inducir tanto promoción de crecimiento de la planta como control biológico de enfermedades (Kloepper, 1980).

Varios mecanismos de control biológico se han descrito para la reducción o supresión de fitopatógenos; los cuales involucran antibiosis, competencia y exclusión de nicho, parasitismo y lisis, resistencia sistémica inducida, hipovirulencia y biosurfactantes. Aunque posiblemente los mecanismo más importantes en bacterias de biocontrol sean la antibiosis y la competencia básicamente por nutrientes (Fravel, 1988).

Antibiosis. Considerando antibiosis como antagonismo mediado por bs metabolitos específicos o no específicos del origen microbiano, por agentes líticos, de enzimas, de compuestos volátiles, o de otras sustancias tóxicas. Los antibióticos se consideran generalmente, ser compuestos orgánicos de concentraciones bajas, los antibióticos son tóxicos al crecimiento u otras actividades metabólicas de otros microorganismos que habitan en el suelo como los fitopatógenos (Fravel, 1988).

Indudablemente los antibióticos son los mecanismos más importantes de control ya que existen evidencias que apoyan en el control biológico y son básicamente cinco tipos; 1) muchos agentes de control biológico producen antibióticos *in vitro*; 2) para algunos agentes de control biológico la producción de antibióticos se correlaciona con la actividad de biocontrol; 3) los antibióticos purificados, filtrados de cultivos o extractos de los filtrados de algunos agentes de biocontrol duplican el efecto de esos agentes; 4) mutantes deficientes en la producción de antibióticos de algunos agentes de biocontrol son menos supresivos que las cepas parentales y la complementación genética restaura la capacidad de biocontrol; 5) algunos antibióticos producidos por agentes de biocontrol pueden aislarse en habitats naturales (Fravel, 1988).

El método de control por antibiosis, se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos. Los antibióticos en el control biológico tienen un papel importante en la supresión de enfermedades, siendo producidos principalmente por bacterias. Existe un gran número de bacterias capaces de producir antibióticos como mecanismo de supresión de enfermedades causadas por

hongos. Entre las principales bacterias como agentes de control biológico se encuentran: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, entre otras. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son los más estudiados por sus propiedades de control biológico, su capacidad antagónica, comúnmente en el suelo distribuida con una alta densidad de población, sobrevive largos periodos y tolera temperaturas altas mejor que otros microorganismos. La investigación *in vitro* para antibiosis se utiliza con frecuencia para seleccionar a posibles antagonistas, aunque la antibiosis *in vitro* puede no ser relacionada al biocontrol en el campo (Fravel, 1988).

Competencia. Se puede definir como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Consiste en la lucha de los organismos como agentes de control biológico y el patógeno por espacio, hospederos y nutrientes, permitiendo el control biológico (Elad *et al.*, 1985).

Parasitismo. Este mecanismo de control biológico, es un fenómeno que ocurre frecuentemente en algunos hongos. Se considera que este mecanismo junto con la antibiosis y sideróforos son los principales mecanismos de antagonismo, el parasitismo consiste en que un organismo (normalmente hongo) ataca a otro organismo (hongo) y consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Hasta la década de los setentas no se consideraba a este mecanismo como una herramienta efectiva en el control biológico. Los micoparásitos más ampliamente utilizados por su potencial en el control biológico son: *Trichoderma* y *Gliocadium* (Lumsden y Locke, 1989).

Resistencia Sistémica Inducida. La resistencia se refiere a la capacidad de una planta de resistir o suprimir el desarrollo del patógeno mediante mecanismos bioquímicos, físicos y estructurales de resistencia, cuando esta ha sido estimulada previamente. Investigaciones recientes demostraron que algunas rizobacterias promotoras del crecimiento, protegen a las plantas de varios patógenos por inducción de resistencia sistémica (Bernard, 1995).

Hipovirulencia. Este fenómeno puede definirse como, la reducción de la virulencia de una cepa de un patógeno, como resultado de la presencia de ácido ribonucleico de doble cadena (dsRNA) (Agrios, 1998). Las moléculas de dsRNA en las cepas hipovirulentas se encuentran en el citoplasma y son transmisibles entre las cepas solamente por anastomosis, las cepas virulentas que reciben esas moléculas se vuelven hipovirulentas; el mecanismo por el cual los dsRNA causan hipovirulencia, aun es desconocido (Kempe y Sequeira, 1983).

Biosurfactantes. Los biosurfactantes son referidos a aquellos compuestos que poseen una parte polar y una no polar, los más comunes son del grupo de los ramnolípidos, que son producidos por diversas especies de bacterias, entre ellas *P. aureofascines* la cual produce un biosurfactante sumamente activo sobre *Phytophthora capsici*, el mecanismo de control esta dado en la intercalación de la parte polar del biosurfactante en la membrana de las zoosporas del patógeno (Papavizas, 1981).

Producción de Sideróforos. Uno de los mecanismos de competencia más ampliamente estudiado en el control biológico es la producción de sideróforos como mecanismo de control biológico. Estos se han asociado también con la capacidad de incrementar el desarrollo y el rendimiento de las plantas (Kleopfer *et al.*, 1989). Los sideróforos son compuestos extracelulares de bajo peso molecular producidos por muchos microorganismos aerobios y anaerobios facultativos con una afinidad muy alta para el hierro férrico. Se ha reportado recientemente que los sideróforos tienen la capacidad de secuestrar el hierro, lo que proporciona una ventaja competitiva a los microorganismos ya que queda poco disponible para fitopatógenos de suelo como *Fusarium spp.*, entre otros. Estos sideróforos secuestran el Fe^{3+} y lo regresan al interior de la célula bacteriana, también pueden solubilizarlo en el suelo y hacerlo disponible para la planta (Virgen, 2000).

Mecanismos de Promoción de Crecimiento

Las PGPR juegan un papel importante en el control de varios patógenos propios del suelo, siendo también benéficas para varias plantas directamente por la producción de metabolitos que estimulan el crecimiento de la raíz y el crecimiento de las plantas o bien, activan la inducción de adquirir un sistema de resistencia. En cuanto al efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, las PGPR pueden actuar de manera directa o indirecta:

Mecanismos directos: ocurre cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta.

Mecanismos indirectos: los metabolitos producidos por las PGPR pueden funcionar como determinantes antagónicos, involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas o inducción de mecanismos de resistencia (Virgen, 2000).

La conjunción de ambos mecanismos de acción (biológico y promoción de crecimiento) ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de un 30 por ciento en la producción de cultivos de interés comercial. Dentro de los principales mecanismos de promoción de crecimiento se encuentran la producción de sideróforos antes mencionados, producción de fitohormonas y solubilización de minerales principalmente (Jiménez *et al.*, 2001).

Producción de Fitohormonas. Algunas PGPR interactúan con sus hospederos mejorando su crecimiento, debido a la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citoquininas). Por otra parte, también se ha demostrado que algunas cepas de *Bacillus* son capaces de producir ciertas cantidades de compuestos parecidos a las giberelinas y la producción de estas, se ha correlacionado con un mayor crecimiento de las plantas, así como de uniformidad en el desarrollo (Carletti, 2000).

Solubilización de Minerales. Muchos de los minerales o elementos necesarios para el desarrollo de las plantas en ocasiones se encuentran poco disponibles, las razones

pueden ser diversas, pero frecuentemente incluyen; retención por partículas o agregados del suelo, pH del suelo, o formas no asimilables para las plantas. Algunos de los métodos para aislar PGPR puede hacerse mediante el uso de 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), como la única fuente de nitrógeno, las bacterias con esta actividad promueven el desarrollo y la elongación de las raíces por la inhibición del etileno, lo cual favorece la toma de nutrientes, entre ellos el fósforo debido a la solubilización del mismo (Penrose, 2001).

Antecedentes del Uso de Aislados de *Bacillus* B1, B3, B9 y B13 en Otros

Patosistemas

García (2002) realizó pruebas de antagonismo *in vitro* sobre grupos de anastomosis de *R. solani* en el cultivo de papa y reportó a *Bacillus* B1 dentro de los mejores tratamientos respecto al testigo comercial con *Bacillus subtilis* y al testigo absoluto; los mejores resultados se observaron en los grupos de anastomosis AG-9 y AG-13.

Cruz (2004) evaluó *in vitro* los aislados de *Bacillus* B3 y B9 contra *R. solani* en el cultivo de papa. *Bacillus* B3 presentó un 35.5 por ciento de inhibición al patógeno y *Bacillus* B9 un 40.4 por ciento en comparación al testigo absoluto. De igual manera, en evaluaciones de campo, la menor incidencia de la enfermedad se obtuvo con el aislado de *Bacillus* B9 y estadísticamente, la menor severidad con ambos aislados de *Bacillus*. Por otro lado, en la evaluación de rendimiento y calidad del cultivo, el mejor tratamiento para las calidades Gigante, Primera, Segunda y Tercera se obtuvo con *Bacillus* B9; y el

tratamiento con *Bacillus* B3 fue estadísticamente igual al testigo químico; ambos tratamientos superaron al testigo absoluto.

García (2004) determinó el efecto estimulante de *Bacillus* B1 y B13 como promotoras de crecimiento sobre el desarrollo y producción del cultivo de chile jalapeño en invernadero y campo. El mayor rendimiento del cultivo se obtuvo con *Bacillus* B1 en los tres cortes realizados bajo condiciones de invernadero; ambos tratamientos de *Bacillus* en condiciones de campo superaron al testigo comercial de *Bacillus subtilis* y al testigo absoluto en los primeros dos cortes realizados; así como, al final del cultivo con el menor número de plantas muertas por la pudrición de raíz.

Ordaz (2004) reportó los mejores tratamientos en evaluaciones *in vitro* a *Bacillus* B1 y B3 que superaron al testigo comercial de *Bacillus subtilis* y testigo absoluto. Bajo condiciones de invernadero, reportó a *Bacillus* B3 con la mayor producción al final del cultivo. Ambos tratamientos fueron estadísticamente iguales en peso de follaje y peso de tubérculos en comparación al testigo químico.

García (2004) señaló a *Bacillus* B1 con la mejor actividad antagónica *in vitro* sobre cuatro cepas de *Colletotrichum coccodes*, agente causal del paño de la papa y alcanzó hasta un 61.8 por ciento de inhibición hacia el patógeno. *Bacillus* B9 y B13 con valores muy similares hasta en un 44.3 por ciento de inhibición y finalmente *Bacillus* B3 con un 35.7 por ciento los cuales superaron estadísticamente al testigo absoluto.

Aguirre (2005) utilizó los aislados de *Bacillus* B1, B3, B9 y B13 para control de *Alternaria dauci* en el cultivo de zanahoria bajo condiciones *in vitro*, invernadero y campo. *Bacillus* B1 inhibió *in vitro* en un 53.4 por ciento respecto al testigo absoluto; seguidos de *Bacillus* B3, B13 y B9 con 48.4, 46.2 y 40.3 por ciento respectivamente y superaron al testigo químico y absoluto. En pruebas de invernadero, la menor incidencia y severidad de la enfermedad se presentó en el tratamiento con *Bacillus* B3, con un 10 por ciento de plantas enfermas y *Bacillus* B1, B9 y B13 con un 25 por ciento en comparación al testigo químico que alcanzó un 75 por ciento de incidencia y severidad de la enfermedad y el 100 por ciento en el testigo absoluto; señaló también a todos los tratamientos con *Bacillus* como promotores de crecimiento en altura, diámetro de raíz y longitud de raíz. Bajo condiciones de campo, reportó una disminución en la incidencia de *Alternaria dauci* durante las primeras etapas fenológicas del cultivo, lo que le permitió a las plantas con tratamiento de *Bacillus* un mejor desarrollo y una menor severidad de la enfermedad al final del cultivo.

De la Garza (2005) reportó la inhibición *in vitro* sobre fitopatógenos asociados a la marchitez de chile. El aislado de *Bacillus* B1 con 41.1 por ciento de inhibición contra *P. capsici* y 29.0 por ciento contra *F. oxysporum*; *Bacillus* B3 con un 37.9 y 27.2 por ciento hacia *R. solani* y *F. oxysporum* respectivamente; *Bacillus* B9 inhibió a *F. oxysporum* con un 31.4 por ciento y finalmente *Bacillus* B13 inhibió a *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum* con 25.4, 35.1 y 31.3 por ciento respectivamente, todos los tratamientos superaron al testigo absoluto.

Pruebas de Identificación de Bacterias

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número, dependen principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación. Las cepas destinadas para un fin deben estar ampliamente identificadas y clasificadas taxonómicamente. Los métodos fenotípicos son altamente dependientes del ambiente en el cual crecen los microorganismos, sin embargo el genotipo es un camino seguro de mapeo de interrelaciones y es independiente de las condiciones de crecimiento ambiental (Saitou y Nei, 1987). La secuencia de la pequeña subunidad del gen RNA ribosomal que posee una sola molécula de rRNA 16S, es altamente conservada. En las bacterias, este gen se ha propuesto por amplificación selectiva de esta secuencia a partir del DNA genómico y comparando los resultados de bases de datos, los microorganismos pueden ser caracterizados como filotipos y puestos en el árbol filogenético. Las pruebas de identificación más utilizadas son las pruebas bioquímicas, pruebas en placas Biolog y métodos moleculares como la secuencia del gen ribosomal 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Altschul *et al.*, 1990).

Pruebas Bioquímicas

La identificación de un aislamiento bacteriano puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de

similitudes. Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, llamadas pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas), a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo, y que la bacteria al crecer transforma o no. Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos, al proponer el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano, porque simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, dado que, proveen los reactivos listos para su uso o son totalmente automatizables (Garrity *et al.*, 2001).

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano. Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.), que puede ser diferente aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos. Por ejemplo, se debe suplir con factores de crecimiento el medio de cultivo para estudiar la fermentación de distintos azúcares, cuando se sabe que el microorganismo en estudio es exigente. A la determinación de la especie se puede llegar según diversos sistemas (manuales de identificación, comerciales, etc.) (Garrity *et al.*, 2001).

Existen diferentes sistemas de clasificación de bacterias desde el punto de vista bioquímico (Biotipo) y puede ser el siguiente:

- 1) Obtener un cultivo puro
- 2) Examen microscópico de células vivas y de frotis teñido por coloración Gram. Se determina así la forma y el Gram del microorganismo en estudio. También es importante determinar la agrupación y la presencia de esporas y otras características morfológicas de interés.
- 3) Determinar las características nutricionales (en general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores); fotoautótrofos, fotoheterótrofos, quimioautótrofos, quimioheterótrofos.
- 4) Realización de un grupo de pruebas, denominadas pruebas primarias, con las cuales se puede determinar el género, grupo de géneros o en algún caso familia a la que pertenece un aislamiento. Las pruebas primarias son: Gram, morfología, catalasa, oxidasa, OF, fermentación de glucosa, esporas, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad.
- 5) Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de llegar a especie. Estas dependerán del género o familia determinado. (Ej: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina deaminasa, etc.) (Garrity *et al.*, 2001).

Pruebas en Microplacas Biolog

La prueba en microplacas para identificación de Gram positivos (GP2) es un método estandarizado el cual utiliza 95 reactivos bioquímicos para la identificación de

un gran rango de microorganismos Gram positivos. Utilizando un software para la identificación del patrón metabólico de la bacteria. Las microplacas de Biolog son pruebas de la capacidad de cierto microorganismo a utilizar u oxidar diferentes fuentes de carbono preseleccionadas. La prueba muestra un patrón característico de color púrpura que constituye una huella metabólica del microorganismo inoculado. Todos los productos bioquímicos necesarios del microorganismo se encuentran contenidos dentro de los 95 pozos. El violeta tetrazolio se utiliza como colorante para indicar colorimétricamente la utilización de las fuentes de carbono. La prueba es muy simple; el microorganismo que será identificado se resuspende en un fluido de inoculación (GN/GP-IF) con la densidad celular recomendada. Entonces, la suspensión celular se inocula en la placa, 150 µl por pozo. En los pozos que exista una fuente de carbono que pueda ser utilizado por el microorganismo ocurrirá un cambio de incoloro a color púrpura por la reducción del tetrazolio de violeta mediante la respiración del microorganismo. Algunos pozos pueden quedar incoloros al igual que el pozo A-1 que es el control y el cual no tiene ninguna fuente de carbono (Biolog, 1999).

El patrón de los pozos color púrpura se afina en el programa de computación MicroLog, el cual hace una revisión automáticamente de una biblioteca extensa de las especies hasta encontrar un patrón que coincida e identificar al microorganismo. Para obtener resultados reproducibles es necesario seguir algunas recomendaciones como lo son: la utilización de cultivos puros, puesto que el sistema no está diseñado para identificar una mezcla de cepas, cultivos nuevos y con pocas resiembras, ya que algunos microorganismos pueden producir diferentes patrones metabólicos dependiendo de que tan viejos sean o al número de resiembras que tenga. Los componentes a utilizar deberán

estar estériles para realizar la técnica. Las contaminaciones pueden afectar los resultados. Algunas especies son muy sensibles a los choques térmicos por lo que deberán calibrarse cuidadosamente con el turbidimétero y preparar el inóculo con la densidad especificada (Biolog, 1999).

Prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una de las técnicas esenciales para la preparación de huellas genéticas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una síntesis cíclica enzimática en donde las cadenas de DNA son copiadas *in vitro*. Los compuestos requeridos para un PCR son el DNA blanco, iniciadores específicos que franquean el gen o segmento que se pretende amplificar, una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), iones magnesio y una enzima, DNA-polimerasa termo estable (Sambrook *et al.*, 1989).

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos. El producto de la extensión del primer ciclo sirve de molde para el siguiente, de tal modo que el número de copias de DNA blanco se duplica exponencialmente en cada ciclo de la polimerización. Partiendo de una molécula de DNA de doble cadena, en 30 ciclos de síntesis redituaría una cantidad teórica de un billón. La PCR es usada en una variedad amplia de aplicaciones incluyendo mapas

genéticos, secuenciaciones de DNA, secuencias de ciclos, sitios directos de mutagénesis, clonación, etc (Sambrook *et al.*, 1989).

Secuenciación del Gen Ribosomal 16S

El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas (algas, hongos, protozoos) como procariotas (bacterias y arqueas). También encontramos virus y bacteriófagos. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas, y también contribuyen a las características propias del suelo por su papel en la modificación de las fases sólida, líquida y gaseosa antes mencionada. Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el azufre, el fósforo, el hierro y otros metales, fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos, degradación de compuestos xenobióticos, etc (Nogales, 2005).

La utilización de ácidos nucleicos aplicada al estudio de comunidades microbianas, se ha impuesto rápidamente debido a la gran cantidad de información que proporciona; y a la relativa facilidad metodológica que implican los análisis de estos compuestos, especialmente tras el gran desarrollo tecnológico que ha experimentado la biología molecular durante los últimos veinte años (Nogales, 2005).

La descripción de los microorganismos como las bacterias, experimento un gran avance gracias a la utilización de la información que proporcionan los genes que

codifican para RNA ribosómico, y en particular el gen que codifica para la subunidad menor del ribosoma bacteriano, 16S rRNA (y su equivalente en eucariotas, 18S rRNA). Este marcador molecular presenta una serie de ventajas: (1) esta presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos ellos; (2) debido a restricciones estructurales, diferentes regiones de la molécula presentan distinto grado de variabilidad en secuencia, lo que permite realizar comparaciones con diferente nivel de resolución; (3) su transmisión es principalmente vertical ya que se considera que no está sujeto a transferencia genética horizontal entre microorganismos; (4) la longitud de secuencia tiene un tamaño adecuado como para proporcionar suficiente información, con un costo asumible, y (5) el análisis de la secuencia nos permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos. La utilización combinada de diferentes técnicas moleculares basadas en el 16S rRNA ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en general (Felske y Akkermans, 1998).

La comprensión del mundo microbiano natural es muy rudimentaria, pero los análisis basados en la secuenciación genómica, ofrecen una vía rápida y eficaz de encaminar estudios hacia un mayor conocimiento. Los genes del rRNA tomados del ambiente son como "fotografías" de los organismos, representativos de diferentes tipos de genomas, los cuales serán objeto de nuevas caracterizaciones si son interesantes o utilizables. Las secuencias del rRNA nos dan una serie de puntos de partida y objetivos en los diferentes organismos, lo que resulta importante, incluso esencial, si se pretende un estudio representativo de la diversidad biológica del mundo microbiano (Rivas *et al.*, 2001).

Como se sabe, el DNA es el material de los genes; la secuenciación directa del gen que codifica para la subunidad 16S RNA (16S rDNA) producto de la amplificación por PCR es un método muy rápido para identificar bacterias a nivel de especie. Se amplifica el gen ribosomal 16S y posteriormente se secuencia el fragmento específico de la especie de las bacterias que comprende desde el nucleótido 30 al 340. Una vez obtenida la secuencia se compara con las bases de datos de secuencias del National Center for Biotechnology Identification NCBI (por sus siglas en inglés) y se puede determinar la especie para cada muestra estudiada (Nogales, 2005).

Árboles Filogenéticos

La identificación y la clasificación de bacterias son de importancia crucial en la microbiología industrial, médica, agrícola y ecología microbiana. Un número de diversos métodos fenotípicos y genotípicos, se están empleando actualmente para la identificación microbiana y la clasificación. Cada uno de estos métodos permite cierto nivel de la clasificación filogenética, del género, de la especie y subespecie. Específico por otra parte, cada método tiene sus ventajas y desventajas con respecto a la facilidad del uso, de la reproducibilidad, del requisito para el equipo y del nivel de la resolución. Generalmente, los métodos basados en DNA están emergiendo como las maneras más confiables, más simples y baratas de identificar y de clasificar microbios. La asignación de género / especies se ha basado tradicionalmente en métodos de filogenia bajo el análisis de la secuencia del rRNA 16S (Pace, 1996).

Los árboles filogenéticos son la expresión gráfica que muestra que la mayoría del legado de las ciencias biológicas ha enfocado un pequeño fragmento de la diversidad biológica. Actualmente, los métodos basados en rRNA están siendo utilizados para examinar filotipos. Los filotipos que, debido a su abundancia, deben ser contribuidores significativos a la biosfera y han escapado a su determinación hasta que tuvo lugar el desarrollo de los métodos basados en la secuenciación. El descubrimiento de secuencias de rRNA en el medio que divergen más profundamente que lo esperado ha permitido diferenciar los microbios, hasta ahora agrupados como Bacterias (Pace, 1997).

Los continuos estudios de secuencias de los habitantes microbianos han cambiado radicalmente la visión de la diversidad filogenética de las bacterias. Los estudios filogenéticos de cultivos y secuencias han ampliado sustancialmente la apreciación del ámbito de la diversidad bacteriana: en 1987 sólo eran reconocidos 12 líneas filogenéticas de Bacteria, mientras que ahora han podido ser diferenciados al menos de 25-30; La topología del árbol bacteriano es extraordinaria. La diversidad bacteriana parece haber surgido principalmente de una radiación explosiva de líneas, más que de una divergencia secuencial (Pace, 1997).

La distancia evolutiva en los árboles filogenéticos se mide por la distancia entre las líneas. El tiempo de los acontecimientos evolutivos no puede extraerse con seguridad de los árboles filogenéticos. El reloj evolutivo no es constante en los distintos linajes, por eso el tiempo y los cambios no están exactamente correlacionados (Pace, 1997).

Estudios filogenéticos realizados con el gen rDNA 16S, que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosómico han mostrado que éste es un gen muy conservado en la escala evolutiva y parece que reproduce bien la relación entre los seres vivos. Según la filogenia obtenida, los autores proponen que la vida celular sobre la tierra se puede agrupar en tres dominios: bacterias y arqueas (ambos procariotas) y eucariotas (Torsvik *et al.*, 1990).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales en que se desarrolló el presente estudio, se concluye que:

Se identificaron las especies de *Bacillus* B1, B3, B9 y B13 por pruebas bioquímicas, placas Biolog y análisis de secuencia con los siguientes resultados: *Bacillus* B1 como *B. amyloliquefaciens*; *Bacillus* B3 como *B. licheniformis* y *Bacillus* B9 y B13 como *B. subtilis*.

La eficiencia antagónica de los aislados evaluados en el ensayo para la disminución de incidencia y severidad de la enfermedad mostró que, todos los tratamientos con *Bacillus* al final del cultivo fueron los de menor incidencia y no rebasaron más del 29 por ciento mientras que el tratamiento tradicional alcanzó el 57 por ciento y el testigo el 96 por ciento. *B. amyloliquefaciens* (B1) y *B. subtilis* (B13) tuvieron la menor severidad en marchitez y pudrición de raíz con una infección de leve a moderada en comparación al testigo comercial y testigo absoluto que tuvieron una infección de moderada a severa y marchitez en toda la planta.

El efecto de los aislados de *Bacillus* en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile demostró que, a 56 días después de la inoculación *B. subtilis* (B13) y *B.*

amyloliquefaciens estimularon el crecimiento de las plantas en un 33 y 24 por ciento reflejado en la altura respecto al tratamiento tradicional y *B. subtilis* (B13) a 84 días después de la inoculación supero con un 20 y 14 por ciento al testigo y al tratamiento tradicional respectivamente. Por otro lado, *B. amyloliquefaciens* (B1) incrementó el rendimiento del cultivo en los tres cortes realizados, lo que al final del cultivo fue equivalente a cuatro veces mayor producción en comparación al testigo y dos veces en comparación al tratamiento tradicional; el resto de los tratamientos con *Bacillus* superaron al testigo y al tratamiento tradicional con el doble de la producción al final del cultivo.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Rodríguez, G.F., Luján-Favela, M. 2004. Selección de Genotipos de Chile de Arbol y Cayenne en el Estado de Chihuahua. Memorias Primera Convención Mundial del Chile. León, Guanajuato, México. Resume, p. 14.
- Agrios, G.N. 1998. Plant Pathology. Academic Press. San Diego, California. 813 p.
- Aguirre-Aguirre, A. 2005. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. Tesis de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 90 p.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Ayala-Labarrios, L.A. 2002. Uso de la Región entre los Genes Ribosomales 16S y 23S para la Identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *Nebraskensis*. Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila. 63 p.
- Bernard, R.G. 1995. The Enhancement of Plant Growth by Free-Living Bacteria. Can. Journal Microbiology 45:536-599
- Biolog. 1999. GP2 MicroPlate Instructions for Use. Copyright APR. Biolog, Inc.
- Carletti, S. 2000. Use of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Plant Micropropagation. Plant and Soil. 67:221-232.
- Claridades Agropecuarias. 1998. Una Hortaliza de México para el Mundo. Un Horizonte Acerca del Mercado Agropecuario. Revista de Publicación Mensual. 56:3-17
- Cruz-Chavez, L. 2004. Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 69 p.
- De la Garza-Rodríguez, R. 2005. Inhibición *in vitro* de bacterias rizosféricas esporuladas sobre fitopatógenos asociados a la marchitez de chile. Tesis de

- Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 45 p.
- Elad, Y., Baker, R. 1985. The Role of Competition for Nutrients in Biocontrol of *Pythium* damping-off by Bacteria. *Phytopathology* 77:190-195.
- Felske A y Akkermans A. D. L. 1998. Spatial Homogeneity of Abundant Bacterial 16S rRNA Molecules in Grassland Soils. *Microbial Ecol.* 36:31-36
- Fravel, D.R. 1988. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. *Ann. Rev. Phytopathology* 26:75-91.
- García-Flores, J. 2002. Evaluación *in vitro* de Bacterias antagónicas aisladas de la rizósfera de papa contra 13 grupos de anastomosis multinucleados de *Rhizoctonia solani* Kühn. Tesis de Licenciatura Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 67 p.
- García-Licon, N. 2004. Efecto estimulante de Bacterias esporuladas promotoras del crecimiento sobre el desarrollo y producción del chile jalapeño (*Capsicum annuum*) en invernadero y campo. Tesis de Licenciatura Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 63 p.
- García-Medina, A. 2004. Actividad Antagónica *in vitro* de cinco cepas de *Bacillus* spp., sobre *Colletotrichum coccodes* Agente causal del paño de Papa (*Solanum tuberosum* L.) Tesis de Licenciatura en Ingeniero Agrónomo en Producción. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 61 p.
- Garrity, G.M., Boone, D.R., Castenholz, R.W. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 721 p.
- Guigón-López, C., González-González, P.A. 2001. Estudio Regional de las Enfermedades del Chile (*Capsicum annuum* L.) y su Comportamiento Temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 49-56.
- Jiménez-Delgadillo, R., Virgen-Calleros, G., Tabares-Franco, J., Olalde-Portugal, V. 2001. Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: Agro-Biotecnología. *Avance y perspectiva*. 20:395-400.
- Kempe, J., Sequeira, L. 1983. Biological Control of Bacterial Wilt of Potatoes: Attempts to Induce Resistance by Treating Tubers with Bacteria. *Plant Diseases* 67:499-503
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., Miller, T.D. 1980. Effects of Rhizosphere Colonization by Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Potato Plant Development and Yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.

- Kloepper, J.W. 1989. Aqueous Formulation of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Control of Foliar Pathogens. *Phytopathology* 89:540-550.
- Lumsdem, R.D., and Locke, J.C. 1989. Biological Control of Damping-off Caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* with *Gliocadium virens* in Soiles mix. *Phytopathology* 79:361-366.
- Macias-Valdez, L.M., Velásquez-Valle, R., Cabañas-Cruz, B. 2005. Evaluación de cultivares de chile (*Capsicum annuum* L.) de los tipos ancho y mirasol en Aguascalientes, México. Segunda Convención Mundial del Chile. Zacatecas, Zacatecas, México. 282-287 p.
- Martyn, R., Gordon, T.R. 1996. *Fusarium* Wilt of Pepper. Compendium of Solanaceas Diseases. APS Press. United State of America. 87 p.
- Mendoza-Zamora, C. 1999. Enfermedades Fungosas de Hortalizas y Fresa. Memorias Programa de Entomología y Acaralogía. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Resumen, p 17.
- Messiaen, C.M., Blancard, D., Rouxel, F., Lafon, R. 1995. Enfermedades de las Hortalizas. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 576 p.
- Nogales, B. 2005. La Microbiología del Suelo en la Era de la Biología Molecular: Descubriendo la Punta del Iceberg. Ecosistemas 2005/2. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. 1-10 p.
- Nuez-Viñals, F., Gil-Ortega, R., Costa-García, J. 1996. El Cultivo de Pimientos, Chile y Ajíes. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 607 p.
- Ordaz-Silva, S. 2004. Control microbiano mediante bacterias esporuladas de la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solani*) Kühn en invernadero. Tesis de Licenciatura Ingeniero Agrónomo Parasitólogo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. 58 p.
- Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for Isolation and Characterization ACC Deaminase-Containing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Physiology Plant* 118:10-15.
- Papavizas, G.C. 1981. Biological Control in Crop Production. London:Allanheld Osmun, 461 p.
- PACE, N. R.; 1996.- New Perspective on the Natural Microbial World: Molecular Microbial Ecology. AMS News, vol. 62, n° 9: 463-470.
- PACE, N. R.; 1997.- A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*, 276: 734-740.

- Pérez-Moreno, L., Durán-Ortiz, L.J., Ramírez-Malagon, R., Sánchez-Pale, J.R., Olalde-Portugal, V. 2004. Sensibilidad *in vitro* de Aislados del Hongo *Phytophthora capsici* a Funguicidas. Memorias Primera Convención Mundial del Chile. León, Guanajuato, México. Resumen, p. 144-150.
- Pérez-Moreno, L., Casillas-Barajas, A.S., Ramírez-Malagón, R. 2005. El Cultivo del Chile y su Importancia Económica en el Norte del Estado de Guanajuato, México. Memorias Segunda Convención Mundial del Chile. Zacatecas, Zacatecas, México. Resumen, p. 368.
- Pernezny, K., Robert, P.D., Murphy, J.F., Goldberg, N.P. 2003. Compendium of Pepper Diseases. APS Press. The American Phytopathological Society. 63 p.
- Productores de Hortalizas. 2004. Plagas y Enfermedades de Chiles y Pimientos. Guía de identificación y manejo. 38 p.
- Rivas, R., Sánchez-Marquez S., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, E. 2005. Martelella mediterránea gen. nov., sp. nov., a novel β -proteobacterium isolated from a subterranean saline lake. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:955-959.
- Romero-Cova, S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección General del Patronato Universitario. Texcoco, Estado de México. 347 p.
- SAGARPA. 2002. Estadísticas agrícolas del ciclo primavera-verano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. No. 386/02.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Components of the Polymerase Chain Reaction. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 115 p.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chum, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Third edition. APS press St. Paul, Minnesota. p. 250-260.
- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Leolliott, R.A., Archer, S.A. 1988. Manual de Enfermedades de las Plantas. 592 p.
- Sneh B., Burpee L., Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. Ed. APS The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. p. 133.

- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., and Baker, R. 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerium* as affected by fluorescent and lytic bacteria from a *Fusarium* suppressive soil. *Phytopathology* 74:1115-1125.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. y Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782-787.
- Utkhede, R.S. 1984. Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. *Can. J. Bot.* 62:1032-1035.
- Van Veen, J.A., Van Oberbeek, L.S. and Van Elsas, J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilera, M.M. y Luna-Ruíz, J. de J. 2001. Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181.
- Velásquez-Valle, R., Medina -Aguilera, M.M., Macias-Valdez, L.M. 2004. Pudrición de Raíz de Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte Centro de México. *Memorias Primera Convención Mundial del Chile*. León, Guanajuato, México. Resumen, p. 138.
- Virgen-Calleros, G. y García-Camargo, J. 1990. Resultados preliminares sobre control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* con *Bacillus subtilis* en sandía, bajo condiciones de campo. *Memorias XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Culiacán, Sinaloa, México. Resumen, p. 105.
- Virgen-Calleros, G., Vázquez-Vázquez, J.L., Anguiano-Ruvalcaba, G.L., Olalde-Portugal, V y Hernández-Delgadillo, R. 1997. Aislamiento de bacterias de la rizósfera de *Capsicum annuum* L. antagónicas al desarrollo de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 15:43-47.
- Virgen-Calleros, G. 1998. Avances del proyecto: Epidemiología y Manejo Integrado de Problemas Fitosanitarios en Agave. Consejo Regulador del Tequila. Guadalajara, Jalisco, México. 30 p.
- Virgen-Calleros, G. 2000. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPR): Importancia en el Crecimiento y Fitosanidad. *Memorias Simposium Internacional de la Fresa*. Zamora, Michoacán, México. Resumen, p. 51.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Phytopathology* 26:379-407.
- Wulff, E.G., Mguni C.M., Mansfeld-Giese K., Fels, J., Lübeck, M., Hockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, B.

- subtilis and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51:574-584.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91:181-187.
- Yuen, G.Y., Schroth, M.N., and McCain, A.H. 1985. Reduction of Fusarium wilt of carnation with suppressive and antagonistic bacteria. *Plant Disease* 69:1071-1075.
- Zavaleta-Mejía, E. 1994. Control Biológico de Fitopatógenos con Origen en el Suelo y Perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 12(1):107-111.
- Zehnder, G.W., Yao, C., Murphy, J.F., Sikora, E.R. and Kloepper, J.W. 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. *BioControl* 45:127-137

Apéndice A.1. Altura de plantas de chile a 56 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	43.00	40.20	40.20	41.40
2 (B13)	43.40	41.20	43.40	47.00
3 (B3)	46.60	39.80	40.80	43.80
4 (B1)	42.00	43.00	40.60	34.20
5 (B1,B3,B9,B13)	41.60	41.80	43.40	36.80
6 (Testigo)	26.60	36.20	30.80	37.60
7 (Tratamiento tradicional)	34.80	33.40	36.60	36.40

Apéndice A.2. Análisis de varianza para la altura de plantas de chile a 56 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	384.824219	64.137367	5.6152	0.002
BLOQUES	3	0.574219	0.191406	0.0168	0.997
ERROR	18	205.597656	11.422092		
TOTAL	27	590.996094			

C.V. = 8.55 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 9.7841

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice B.1. Número de flores en plantas de chile a 56 días después de la inoculación con rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	2.40	4.00	2.80	3.00
2 (B13)	2.60	4.40	4.20	2.80
3 (B3)	4.00	3.80	2.80	3.80
4 (B1)	3.80	3.40	3.80	3.40
5 (B1,B3,B9,B13)	2.60	4.40	3.20	2.40
6 (Testigo)	0.80	3.80	2.00	4.00
7 (Tratamiento tradicional)	1.80	2.60	3.40	3.20

Apéndice B.2. Análisis de varianza para número de flores en plantas de chile a 56 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	3.754272	0.625712	1.0292	0.439
BLOQUES	3	5.057098	1.685699	2.7728	0.071
ERROR	18	10.942871	0.607937		
TOTAL	27	19.754242			

C.V. = 24.47 %

Apéndice C.1. Número de frutos de plantas de chile a 56 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	1.20	1.40	0.40	1.20
2 (B13)	2.00	1.00	1.00	1.40
3 (B3)	1.60	0.40	1.40	0.80
4 (B1)	1.00	1.20	2.20	0.60
5 (B1,B3,B9,B13)	1.40	1.60	2.40	0.20
6 (Testigo)	0.00	1.00	0.80	0.40
7 (Tratamiento tradicional)	0.20	0.20	1.40	0.60

Apéndice C.2. Análisis de varianza para número de frutos en plantas de chile a 56 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANALISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	2.814287	0.469048	1.3687	0.279
BLOQUES	3	1.421425	0.473808	1.3826	0.280
ERROR	18	6.168575	0.342699		
TOTAL	27	10.404287			

C.V. = 25.62 %

Apéndice D.1. Altura de plantas de chile a 84 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	52.80	60.40	62.60	61.80
2 (B13)	64.80	66.40	63.80	70.60
3 (B3)	62.80	56.80	62.20	58.40
4 (B1)	63.40	59.80	62.20	59.40
5 (B1,B3,B9,B13)	66.00	63.00	63.00	62.20
6 (Testigo)	60.00	58.80	54.80	48.60
7 (Tratamiento tradicional)	62.40	55.00	64.60	50.40

Apéndice D.2. Análisis de varianza para altura de plantas de chile a 84 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	304.765625	50.794270	3.0999	0.029
BLOQUES	3	46.382813	15.460938	0.9436	0.558
ERROR	18	294.945313	16.385851		
TOTAL	27	646.093750			

C.V. = 6.68 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 9.4519

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice E.1. Número de flores de plantas de chile a 84 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	10.20	8.40	10.80	9.00
2 (B13)	13.80	17.00	13.20	13.40
3 (B3)	11.20	13.00	13.00	5.60
4 (B1)	16.40	11.20	15.20	10.60
5 (B1,B3,B9,B13)	14.40	10.60	13.40	10.00
6 (Testigo)	11.20	14.00	8.60	14.20
7 (Tratamiento tradicional)	13.00	9.20	10.60	9.00

Apéndice E.2. Análisis de varianza para número de flores en plantas de chile a 84 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANALISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	67.628418	11.271403	2.1566	0.096
BLOQUES	3	25.695313	8.565104	1.6388	0.215
ERROR	18	94.074707	5.226373		
TOTAL	27	187.398438			

C.V. = 19.39 %

Apéndice F.1. Número de frutos de plantas de chile a 84 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	4.00	5.60	4.40	4.00
2 (B13)	5.20	6.40	5.00	3.00
3 (B3)	5.40	5.40	6.60	2.80
4 (B1)	4.60	7.40	7.20	4.80
5 (B1,B3,B9,B13)	5.20	8.60	5.20	5.00
6 (Testigo)	3.00	5.40	5.00	6.60
7 (Tratamiento tradicional)	5.40	6.40	7.00	5.00

Apéndice F.2. Análisis de varianza para número de frutos en plantas de chile a 84 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	9.368835	1.561473	1.2794	0.315
BLOQUES	3	18.491821	6.163940	5.0505	0.010
ERROR	18	21.968201	1.220456		
TOTAL	27	49.828857			

C.V. = 20.68 %

Apéndice G.1. Corte 1 en plantas de chile a 99 días después de la inoculación con rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	2.5950	2.9100	3.0450	2.3700
2 (B13)	3.1850	4.0450	4.2750	3.6550
3 (B3)	2.5650	4.3000	3.9050	2.5450
4 (B1)	3.3650	4.5900	6.0450	3.5550
5 (B1,B3,B9,B13)	1.8650	3.8200	4.7050	2.2000
6 (Testigo)	0.7850	1.7100	2.6350	2.0600
7 (Tratamiento tradicional)	2.9100	6.6850	3.7450	4.2200

Apéndice G.2. Análisis de varianza para el corte 1 en plantas de chile a 99 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANALISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	20.752686	3.458781	6.2176	0.001
BLOQUES	3	13.076752	4.358917	7.8358	0.002
ERROR	18	10.013123	0.556285		
TOTAL	27	43.842560			

C.V. = 22.15 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 2.1592

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice H.1. Corte 2 en plantas de chile a 113 días después de la inoculación con rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	1.8650	2.6600	2.8500	2.2250
2 (B13)	3.5950	3.2100	4.0550	2.7850
3 (B3)	2.9400	3.0400	3.7400	2.5000
4 (B1)	3.9050	3.4050	5.8150	2.9450
5 (B1,B3,B9,B13)	2.4650	2.3850	3.8700	2.4850
6 (Testigo)	1.4050	1.5900	1.7500	2.1100
7 (Tratamiento tradicional)	2.0150	2.9650	2.9850	2.7900

Apéndice H.2. Análisis de varianza para el corte 2 en plantas de chile a 113 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANALISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	12.957352	2.159559	8.4891	0.000
BLOQUES	3	4.874374	1.624792	6.3870	0.004
ERROR	18	4.579041	0.254391		
TOTAL	27	22.410767			

C.V. = 17.58 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 2.0919

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.33, 5.17

Apéndice I.1. Corte 3 en plantas de chile a 146 días después de la inoculación con rizobacterias en campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	3.8780	3.3200	5.4250	3.5450
2 (B13)	2.7050	4.0550	6.7500	2.3500
3 (B3)	2.6700	2.5100	6.5050	4.3550
4 (B1)	5.5040	7.6300	7.1580	6.4930
5 (B1,B3,B9,B13)	2.6200	3.5000	6.9650	4.1410
6 (Testigo)	1.0930	0.7200	0.4950	0.1000
7 (Tratamiento tradicional)	1.1000	1.7600	1.3750	2.1370

Apéndice I.2. Análisis de varianza para corte 3 en plantas de chile a 146 días después de la inoculación de rizobacterias en campo.

ANALISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	94.996582	15.832764	13.5743	0.000
BLOQUES	3	18.441254	6.147085	5.2702	0.009
ERROR	18	20.994812	1.166378		
TOTAL	27	134.432648			

C.V. = 30.01 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 2.0919

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.33, 5.17

Apéndice J.1. Incidencia de plantas de chile enfermas en el corte 1 del ensayo de campo.

B L O Q U E S (Datos originales)				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	8.70	2.17	2.17	2.17
2 (B13)	6.52	2.17	6.52	4.35
3 (B3)	4.35	2.17	2.17	2.17
4 (B1)	2.17	2.17	2.17	4.35
5 (B1,B3,B9,B13)	2.17	6.52	2.17	2.17
6 (Testigo)	4.35	15.22	6.52	4.35
7 (Tratamiento tradicional)	10.87	10.87	6.52	4.35

B L O Q U E S (Datos transformados por arcoseno)				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	17.16	8.33	8.33	8.33
2 (B13)	14.77	8.33	14.77	11.97
3 (B3)	11.97	8.33	8.33	8.33
4 (B1)	8.33	8.33	8.33	11.97
5 (B1,B3,B9,B13)	8.33	14.77	8.33	8.33
6 (Testigo)	11.97	22.95	14.97	11.97
7 (Tratamiento tradicional)	19.19	19.19	14.77	11.97

Apéndice J.2. Análisis de varianza para la incidencia de plantas enfermas de chile en el corte 1 del ensayo de campo.

A N A L I S I S D E V A R I A N Z A					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	208.214355	34.702393	2.8506	0.039
BLOQUES	3	36.792725	12.264241	1.0074	0.414
ERROR	18	219.125732	12.173652		
TOTAL	27	464.132813			

C.V. = 29.37 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 8.1470

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice K.1. Incidencia de plantas de chile enfermas en el corte 2 del ensayo de campo.

B L O Q U E S (Datos originales)				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	17.39	4.35	10.87	13.04
2 (B13)	10.87	15.22	10.87	8.70
3 (B3)	15.22	13.04	10.87	13.04
4 (B1)	15.22	4.35	10.87	13.04
5 (B1,B3,B9,B13)	15.22	15.22	17.39	15.22
6 (Testigo)	56.52	54.35	63.04	50.00
7 (Tratamiento tradicional)	34.78	26.09	32.61	39.13

B L O Q U E S (Datos transformados por arcoseno)				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	24.65	11.97	19.19	21.13
2 (B13)	19.19	22.95	19.19	17.16
3 (B3)	22.95	21.13	19.19	21.13
4 (B1)	22.95	11.97	19.19	21.13
5 (B1,B3,B9,B13)	22.95	22.95	24.65	22.95
6 (Testigo)	48.73	47.47	52.53	45.00
7 (Tratamiento tradicional)	36.09	30.66	34.82	38.70

Apéndice K.2. Análisis de varianza para incidencia de plantas enfermas de chile en el corte 2 del ensayo de campo.

A N A L I S I S D E V A R I A N Z A					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	3010.298828	501.716461	49.0097	0.000
BLOQUES	3	60.945313	20.315104	1.9845	0.152
ERROR	18	184.267578	10.237087		
TOTAL	27	3255.511719			

C.V. = 12.06 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 9.2627

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice L.1. Incidencia de plantas de chile enfermas en el corte 3 del ensayo de campo.

B L O Q U E S (Datos originales)				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	34.78	13.04	15.2200	19.57
2 (B13)	34.78	32.61	13.0400	21.74
3 (B3)	34.78	32.61	19.5700	28.26
4 (B1)	23.91	13.04	19.5700	21.74
5 (B1,B3,B9,B13)	19.57	19.57	21.7400	19.57
6 (Testigo)	93.48	97.83	95.6500	100.00
7 (Tratamiento tradicional)	58.70	60.87	56.5200	54.35

B L O Q U E S (Datos transformados)				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	36.09	21.13	22.95	26.21
2 (B13)	36.09	34.82	21.13	27.76
3 (B3)	36.09	34.82	29.21	32.08
4 (B1)	29.27	21.13	29.21	27.76
5 (B1,B3,B9,B13)	26.21	26.21	27.76	26.21
6 (Testigo)	75.11	81.47	77.89	90.00
7 (Tratamiento tradicional)	50.01	51.24	48.73	47.47

Apéndice L.2 Análisis de varianza para incidencia de plantas enfermas de Chile en el corte 3 del ensayo de campo.

A N A L I S I S D E V A R I A N Z A					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	9816.175781	1636.029297	71.9580	0.000
BLOQUES	3	76.507813	25.502604	1.1217	0.367
ERROR	18	409.246094	22.735893		
TOTAL	27	10301.929688			

C.V. = 12.20 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 13.8040

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice M.1. Severidad en marchitez de plantas de chile al final del cultivo en el ensayo de campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	3.40	3.20	3.00	2.40
2 (B13)	2.60	3.00	2.80	2.60
3 (B3)	3.00	3.20	3.00	3.00
4 (B1)	2.20	2.00	1.40	2.80
5 (B1,B3,B9,B13)	2.60	2.40	3.40	3.20
6 (Testigo)	3.80	3.80	3.80	4.00
7 (Tratamiento tradicional)	3.60	3.40	3.60	3.40

Apéndice M.2. Análisis de varianza para severidad en marchitez de plantas de chile al final del cultivo en el ensayo de campo.

ANÁLISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	7.417068	1.236178	9.1403	0.000
BLOQUES	3	0.015640	0.005213	0.0385	0.989
ERROR	18	2.434402	0.135245		
TOTAL	27	9.867111			

C.V. = 12.17 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.01

TUKEY = 1.0674

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice N.1. Severidad en pudrición de raíz de plantas de chile al final del cultivo en el ensayo de campo.

BLOQUES				
Tratamiento	1	2	3	4
1 (B9)	2.80	3.20	3.40	2.80
2 (B13)	2.60	3.00	2.80	3.00
3 (B3)	3.00	3.40	3.20	3.40
4 (B1)	2.40	2.20	1.60	3.20
5 (B1,B3,B9,B13)	2.60	2.80	3.20	3.60
6 (Testigo)	3.60	4.00	3.80	4.00
7 (Tratamiento tradicional)	3.20	3.40	3.60	3.00

Apéndice N.2. Análisis de varianza para severidad en pudrición de raíz de plantas de chile al final del cultivo en el ensayo de campo.

ANALISIS DE VARIANZA					
FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	6	5.019989	0.836665	7.0942	0.001
BLOQUES	3	0.577179	0.192393	1.6313	0.217
ERROR	18	2.122864	0.117937		
TOTAL	27	7.720032			

C.V. = 11.08 %

NIVEL DE SIGNIFICANCIA = 0.05

TUKEY = 0.9942

VALORES DE TABLAS (0.05), (0.01) = 4.67, 5.79

Apéndice O.1. Resultados de análisis de secuencia del gen ribosomal 16S para identificación de las rizobacterias evaluadas en el ensayo de campo.

***Bacillus amyloliquefaciens* (B1)**

-----	-----	----- TGTG	CTCTTGGTTC
ACGTC CCTGC	TGGCTTCAC	CAACTGCTGT	TCTTTGTTT---
CTGGATAACG	G--AAGTTCTT	CG--CAATTCT	GTTGGTAAGT
GCAAGATCTC	TCTGCCTGTT	GATTCTTTTT	--AACGGTATT
CTTGAAAGG	GCGCACGGTG	TATGCCTTGC	CACTACCAAC
CGATGAAAGC	CGGAACCCAC	ACCGATTTGC	TTCGGGGAGC
TGTAAGCAAG	CTTTGATCCG	GAGATTTCCG	AATGGGGAAA
CCCGGAA			

***Bacillus licheniformis* (B3)**

-----	-----	-----	-----
-----TTNCCGT	TANGCTCCCC	CA--CG---TGT	TCTTTGAAAA
CTAAATAACG	ATAAGTAAGA	CATCACATTC	AAAAGTAAGA
CCAAGAA--TA	ACTG---TAGT	GATTCTTTTT	TAACGGTTAA
GTTAGAAAGG	GCGCACGGTG	GATGCCTTGG	CACTAGGAGC
CGATGAAGGA	CGGGACGAAC	ACCGATATGC	TTCGGGGAGC
TGTAAGCAAG	CTTTGATCCG	GAGATTTCCG	AATGGGGAAA
CCCGGAA			

***Bacillus subtilis* (B9)**

C--G--GATTAC	TCCTGCATAG	TTCGCTCTTG	GACCTCGGTT
CAGATCCCGC	TAGGCTCCAC	CA---CG--TGT	TCTTTGAAAA
CTAGATAACG	ATAAGTAAGA	CATCACATTC	AAAAGTAAGA
CCAAGAA--TA	ACTG----TAGT	GATTCTTTTT	TAACGGTTAA
GTTAGAAAGG	GCGCACGGTG	GATGCCTTGG	CACTAGGAGC
CGATGAAGGA	CGGGACGAAC	ACCGATATGC	TTCGGGGAGC
TGTAAGCAAG	CTTTGATCCG	GAGATTTCCG	AATGGGGAAA
CCCGGAA			

***Bacillus subtilis* (B13)**

-----	-----TGCCGTT	GCCGCAGGAG	GTCAGCGGTT
CCATGCCCGC	TAGGCTCCAC	CAACG---TGT	TCTTTGAAAA
CTAGATAACG	ATAAGTAAGA	CATCACATTC	AAAAGTAAGA
CCAAGAA-TA	ACTG---TAGT	GATTCTTTTT	TAACGGTTAA
GTTAGAAAGG	GCGCACGGTG	GATGCCTTGG	CACTAGGAGC
CGATGAAGGA	CGGGACGAAC	ACCGATATGC	TTCGGGGAGC
TGTAAGCAAG	CTTTGATCCG	GAGATTTCCG	AATGGGGAAA
CCCGGAA			
