

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL CHILE
DEL SUR DE TAMAULIPAS Y SU BIOCONTROL CON CINCO ESPECIES DEL
GÉNERO *Bacillus*.

Tesis

Que presenta ROCÍO DE JESÚS DÍAZ AGUILAR
Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

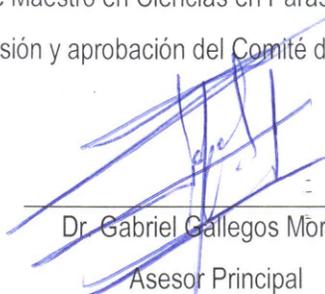
Saltillo, Coahuila

Julio, 2019

HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL CHILE
DEL SUR DE TAMAULIPAS Y SU BIOCONTROL CON CINCO ESPECIES DEL
GÉNERO *Bacillus*.

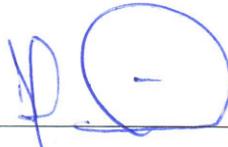
Tesis

Elaborada por ROCÍO DE JESÚS DÍAZ AGUILAR como requisito parcial para
obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor Principal



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor



M.C. César Alejandro Espinoza Ahumada

Asesor



Dr. Sixto Velarde Félix

Asesor



Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Julio, 2019

AGRADECIMIENTOS

Al comité de asesoría

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por compartir sus conocimientos y por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo, por su valiosa aportación de conocimientos para la elaboración de este trabajo y por los consejos que me ayudaron en mi crecimiento profesional.

Al Dr. Sixto Velarde Félix, por todo el apoyo brindado y las valiosas aportaciones para este proyecto.

M.C. César Alejandro Espinoza Ahumada por las aportaciones y por compartir sus conocimientos que ayudaron a enriquecer mi formación profesional.

Al Departamento de Parasitología Agrícola

Por todo el apoyo y atenciones brindadas para la elaboración de este proyecto.

A los maestros del Departamento de Parasitología Agrícola por su valiosa aportación de conocimientos en mi formación.

A mis amigos y compañeros del posgrado por el apoyo incondicional, por acompañarme en los momentos difíciles de mi vida.

Al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por el apoyo proporcionado durante el posgrado.

DEDICATORIA

Hasta el cielo: Herminio Díaz López, por impulsarme a conseguir mis metas y por ser el mejor abuelo

A mis padres y a toda mi familia que me apoya incondicionalmente

A las personas que forman parte de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| LISTA DE CUADROS | 3 |
| LISTA DE FIGURAS | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| REVISIÓN DE LITERATURA | 9 |
| Clasificación taxonómica..... | 9 |
| Problemas fitosanitarios | 9 |
| El género <i>Fusarium</i> | 10 |
| El género <i>Rhizoctonia</i> | 10 |
| Generalidades de <i>Phytophthora</i> | 11 |
| Control químico..... | 11 |
| Control biológico de fitopatógenos | 12 |
| Generalidades de <i>Bacillus</i> | 12 |
| Clasificación taxonómica..... | 13 |
| MATERIALES Y METODOS | 14 |
| Ubicación del experimento..... | 14 |
| Aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos | 14 |
| Identificación taxonómica..... | 14 |
| Identificación molecular | 15 |
| Pruebas de patogenicidad | 15 |
| Pruebas preliminares de antagonismo | 16 |
| Bioensayos de antagonismo | 16 |
| Diseño experimental | 17 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| Identificación morfológica..... | 18 |
| Identificación molecular | 21 |
| Pruebas de patogenicidad | 22 |
| Pruebas preliminares de antagonismo | 23 |
| Bioensayos de mezclas de cepas de <i>Bacillus</i> spp..... | 24 |

CONCLUSIONES27

LITERATURA CITADA.....28

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|-----------|
| Cuadro 1. Similitud molecular de cepas aisladas de plantas de chile..... | 21 |
| Cuadro 2. Porcentajes de inhibición ocasionadas por diferentes cepas de <i>Bacillus spp.</i> , con fitopatógenos asociados a la secadera de chile..... | 24 |
| Cuadro 3. Porcentajes de inhibición de mezclas de cepas de <i>Bacillus spp.</i> , para fitopatógenos asociados a la secadera de chile..... | 26 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio PDA..... | 18 |
| Figura 2. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Rhizoctonia solani</i> en medio PDA..... | 19 |
| Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Alternaria alternata</i> en medio PDA..... | 20 |
| Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Mortierella</i> sp en medio PDA..... | 20 |
| Figura 5. Gel de agarosa de productos de PCR obtenidos a partir de ADN de <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i> , <i>A. alternata</i> y <i>Mortierella</i> sp..... | 21 |
| Figura 6. Pruebas de potogenicidad de <i>F. oxysporum</i> , y <i>R. solani</i> en plantas chile..... | 22 |
| Figura 7. Bioensayo de inhibición por <i>Bacillus</i> spp contra <i>F. oxysporum</i> | 25 |

RESUMEN

HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A LA MARCHITEZ DEL CHILE DEL SUR DE TAMAULIPAS Y SU BIOCONTROL CON CINCO ESPECIES DEL GÉNERO *Bacillus*.

POR:

ROCÍO DE JESÚS DÍAZ AGUILAR

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

Se evaluó *in vitro* el antagonismo individual y en mezclas de especies del genero *Bacillus* sobre hongos fitopatógenos asociados a la marchitez del chile, del estado de Tamaulipas. Los patógenos se aislaron de plantas enfermas y se identificaron a nivel especie mediante procedimientos morfológicos y moleculares. Con base en la secuenciación genética se identificó a *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* y *Mortierella* sp. asociados al cultivo. En pruebas de patogenicidad en plantulas de chile 15 días después de la inoculación *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* resultaron patogénicas provocando secadera, amarillamiento y muerte en las plantas, *Alternaria alternata* y *Mortierella* sp. no provocaron daños. En pruebas de efectividad biológica individual *in vitro* mediante confrontación dual utilizando cepas de *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* 1, *B. subtilis* 2, *B. amyloliquefaciens*, *B. liquefaciens* y los hongos fitopatógenos, se observaron diferencias estadísticas significativas ($p= 0,05$) en porcentajes de inhibición entre 33.79% y 50.85%, en mezclas de 3 y 4 cepas de *Bacillus* se obtuvo mayor efectividad biológica con 46.1% y 57.96%. La combinación *in vitro* de mezclas de especies de *Bacillus* incrementa los porcentajes de antagonismo para el control de los fitopatógenos asociados a la secadera de chile.

Palabras clave: control biológico, secadera, *Capsicum annum*, mezclas.

ABSTRAC**PHYTOPATHOGEN FUNGI ASSOCIATED TO THE WILT OF CHILI IN SOUTH OF TAMAULIPAS AND ITS BIOCONTROL WITH FIVE SPECIES OF THE GENUS *Bacillus*.**

BY:

ROCÍO DE JESÚS DÍAZ AGUILAR

MASTER IN SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

The individual antagonism was evaluated *in vitro* and in the mixtures of *Bacillus* species on phytopathogenic fungi associated to the wilt of chili, state of Tamaulipas. Pathogens were isolated from diseased plants and identified at species level by morphological and molecular procedures. Based on genetic sequencing, we identified *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* and *Mortierella* sp. associated with the crop. Pathogenicity tests in chili plants 15 days after the inoculation *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* were pathogenic causing drying, yellowing and death in plants, *Alternaria alternata* and *Mortierella* sp. did not cause damage. In tests of individual biological efficacy *in vitro* by double confrontation using strains of *Bacillus megaterium*, *B. subtilis* 1, *B. subtilis* 2, *B. amyloliquefaciens*, *B. liquefaciens* and the phytopathogenic fungi, statistical differences were observed ($p=0.05$) with percentages of inhibition between 33.79% and 50.85%. The mixtures of 3 and 4 *Bacillus* strains obtained greater biological effectiveness with 46.1% and 57.96%. The *in vitro* combination of mixtures of *Bacillus* species increases the percentages of antagonism for the control of the phytopathogens associated to the wild chilli.

Keywords: biological control, wild, *Capsicum annuum*, mixtures.

INTRODUCCIÓN

La superficie cultivada de chile en México durante el año 2017 fue de 161, 285.22 ha, con una producción de 3, 296, 874.66 ton; los principales estados productores fueron Sinaloa, Zacatecas y Tamaulipas (SIAP, 2017). Las enfermedades causadas por fitopatógenos que se encuentran en el suelo son un factor limitante en la producción de este cultivo (Palma *et al.*, 2017). La marchitez del chile es la enfermedad más importante en este cultivo, como agentes causales se reporta a los fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Lozano *et al.*, 2015), que ocasionan secadera en la planta, marchitez, clorosis, defoliación, maduración adelantada e irregular de los frutos como consecuencia del taponamiento del xilema (Velásquez *et al.*, 2001). Se reportan pérdidas del 40 al 60% de la producción, disminuyendo la superficie de siembra o desplazándose a terrenos vírgenes (Mojica *et al.*, 2009). Para combatir estos fitopatógenos el control químico es el más utilizado, sin embargo, ha ocasionado la inducción de resistencia de los fitopatógenos a las moléculas activas, además de provocar daños al medio ambiente y a la salud humana (Rubio *et al.*, 2008). La aplicación de fungicidas no es suficiente para el control de las enfermedades vegetales, por lo que es necesario buscar otras alternativas (Akgül y Mirik, 2008). En ese sentido, algunas bacterias solubilizan fósforo, fijan nitrógeno y producen moléculas bioactivas que tienen capacidad antifúngica (Badía *et al.*, 2011). Las bacterias de la rizosfera son excelentes agentes de control biológico para patógenos del suelo (Basha y Ulaganathan, 2002), además, promueven el crecimiento, aumentan la producción y el rendimiento de los cultivos (Guo *et al.*, 2015, Samaniego *et al.*, 2017). Las bacterias del género *Bacillus* son las más estudiadas como agentes de biocontrol y son una alternativa eficiente para el manejo de la secadera de chile (Sarti y Miyazaki, 2013), a través de metabolitos secundarios y enzimas, como quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas (Basurto, 2010).

Por lo anterior, este trabajo tiene como objetivo identificar taxonómica y molecularmente los agentes causales de la marchitez del chile y su control por antagonistas del género *Bacillus* de forma individual y en mezclas bajo condiciones *in vitro*, se espera que las combinaciones entre especies antagonistas de *Bacillus* incrementen significativamente los porcentajes de inhibición de los fitopatógenos asociados a la secadera del chile.

REVISIÓN DE LITERATURA

El cultivo de chile

México es el centro de origen y domesticación del chile (*Capsicum annuum* L.), este cultivo es uno de los más importantes por su valor cultural, nutricional y económico, además por la variedad de tamaños de los frutos y por los niveles de capsicina que contienen (Alonso *et al.*, 2008; Aguirre *et al.*, 2017). Actualmente, existen cinco especies domesticadas de este cultivo *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* R. y P., *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* (Tun, 2001). A nivel nacional se conoce una gran diversidad de chiles, Oaxaca es el estado con mayor diversidad con al menos 25 tipos, seguido de Guerrero con 12 registros, Puebla con 10 y Veracruz con nueve (Vera *et al.*, 2016), los más destacados son chile jalapeño, ancho, guajillo, pasilla, serrano, manzano, habanero, de árbol y piquín (Aguilar *et al.*, 2010).

Clasificación taxonómica

El cultivo de chile se clasifica según Valadez (1990) y USDA (2018)

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Género: *Capsicum*

Especie: *C. annuum*

Problemas fitosanitarios

En México, la producción de chile es afectada por diversos factores, entre los que destacan las enfermedades ocasionadas por hongos, algas fitopatógenas, bacterias, virus y nematodos (Guigón y González, 2001). Los principales fitopatógenos que atacan al cultivo del chile son hongos (*Fusarium* spp.,

Rhizoctonia solani) (Chew, 2008), y Omicetes (*Phytophthora* spp. y *Pythium* spp.) (Silva *et al.*, 2009), estos patógenos están asociados a la marchitez del cultivo, considerada la enfermedad más importante a nivel nacional (Anaya *et al.*, 2011), se le reporta en casi todos los estados productores como Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (García *et al.*, 2000). Los síntomas de esta enfermedad son clorosis, necrosis en la base del tallo con desprendimiento de epidermis, pérdida de turgencia de las hojas, frutos, y muerte de la planta (Pérez *et al.*, 2017), además de necrosis del borde de las hojas y muerte descendente de las ramas, nuevo síntoma que se reporta desde el 2016 en lotes comerciales de Durango y Zacatecas (Velásquez y Reveles, 2017).

El género *Fusarium*

Fusarium es el agente causal de pudriciones en diversos cultivos como tomate, chile, melón, ajo, fresa entre otros, se reportan importantes pérdidas económicas en el mundo debido a este fitopatógeno (Groenewald, 2006), que tiene alta capacidad de sobrevivir en materia orgánica (Michielse y Rep, 2009) y se puede recuperar en todos los tipos de suelos ya sean cultivado o no cultivados (Hu *et al.*, 2015) sus principales mecanismos de dispersión son el movimiento de suelo infectado, las corrientes de agua y el uso de semillas infectadas, este patógeno tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a la formación de clamidiosporas como estructuras de resistencia, lo que vuelve inefectiva la rotación de cultivos a corto plazo (Daugovish *et al.*, 2008).

El género *Rhizoctonia*

La capacidad de infección del género *Rhizoctonia* depende de las condiciones de temperatura y humedad (González, 2002), infecta plantas de diferentes

especies como la papa y chile que son de importancia económica (Gour, 2012), en las que produce lesiones castaño-oscuros en raíces y semillas, pudrición de tallos y de las partes de la planta que están en contacto con el suelo (González, 2006). El micelio, es incoloro al principio o de color marrón claro al envejecer, se compone de células alargadas y produce ramificaciones que crecen en ángulos rectos a la hifa principal (Agrios, 2005). Los aislamientos de *Rhizoctonia* se clasifican en base a la reacción de anastomosis hifal, la cual es una respuesta de incompatibilidad vegetativa entre las cepas confrontadas (Carling et al., 2002).

Generalidades de *Phytophthora*

Habita en el suelo y se multiplica a través de esporangios que liberan zoosporas, las cuales se diseminan al ser arrastradas por el agua o por los flagelos que permiten su dispersión (Gonzales *et al.*, 2009), este patógeno ataca a una gran variedad de plantas tanto hortícolas, frutales y ornamentales y causa ahogamiento de plántulas, pudriciones de raíz, además de pudrición blanda en frutos (Agrios, 2005) *Phytophthora capsici* L., causa la enfermedad más devastadora de chile a nivel mundial, en etapas de prefloración y en estado de maduración del fruto ocasionando grandes pérdidas debido a su gran capacidad de crecimiento y velocidad de esporulación (Pérez *et al.*, 2003).

Control químico

Para el control de estos patógenos el control químico es el más utilizado, se reportan aplicaciones de ingredientes activos como N-metil ditiocarbamato de sodio, 2-tiocianometiltio benzotiazol, dimetomorf y tiofanato de metilo (González *et al.*, 2009). En los últimos años debido al uso indiscriminado y a la falta de capacitación en la utilización de estos productos se ha generado resistencia dificultando el manejo agronómico del cultivo (Carmona y Sautua, 2017), además se genera contaminación tanto en el suelo como en los mantos

acuíferos afectando la fauna que ahí habita, en los últimos años se han realizado estudios que demuestran la residualidad de fungicidas e insecticidas químicos sobre hortalizas lo cual genera problemas en la salud humana (Weller, 1988; Pérez *et al.*, 2013).

Control biológico de fitopatógenos

En la rizosfera existen diferentes grupos de antagonistas, entre ellos se encuentran las micorrizas, hongos, bacterias y actinomicetos (Papavizas, 1985); En mayor cantidad se aíslan hongos de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium* y el actinomicete *Streptomyces*, así como bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Agrobacterium* (Harman *et al.*, 2010). Estos microorganismos son importantes para el control biológico de los fitopatógenos, ya que tienen diferentes mecanismos de acción como la competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno y pueden generar resistencia inducida en las plantas (Infante *et al.*, 2009).

Generalidades de *Bacillus*

Las especies de *Bacillus* constituyen un grupo diverso de bacterias ampliamente distribuidas en el suelo (Parvathi *et al.*, 2009), estas colonizan y presentan un nicho ecológico, similar al ocupado por los patógenos vegetales, (Dai *et al.*, 2016), debido a su capacidad de formación de esporas puede sobrevivir en la rizósfera vegetal (Calvo y Zúñiga, 2010). Este género, es considerado eficaz para controlar enfermedades de las raíces y del follaje; tal efecto se atribuye a su diversidad genética y distribución (Dequiedt *et al.*, 2009). Los mecanismos de acción del género *Bacillus* pueden ocurrir de manera directa llevando a cabo la fijación de nitrógeno y la solubilización de minerales, además de producir hormonas del crecimiento vegetal, de manera indirecta produce sustancias que actúan como antagonistas de patógenos induciendo así resistencia a las plantas (Choudhary y Bhavdish., 2009). Numerosas especies

del género *Bacillus* se han reportado como productoras de sustancias con actividad funguicida y bactericida, entre las que figuran subtilisinas, micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas, entre otras (Orbera *et al.*, 2005, Astorga *et al.*, 2014). Las surfactinas es la familia más estudiada de los lipopéptidos induce resistencia sistémica en plantas y tiene la propiedad para proliferar células bacterianas, facilitando así la colonización de la rizósfera (Ongena y Jaques., 2008). La iturrina A suprime el crecimiento de varios tipos de hongos incluyendo *Rhizoctonia solani* (Asaka y Shoda., 1996), algunas cepas de *Bacillus subtilis* producen fengicinas que tienen actividad antifúngica contra los hongos filamentosos ya que hacen que la membrana plasmática de las células sean más permeables (Maget., 1992). La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia que producen los fitopatógenos a productos convencionales (Oard *et al.*, 2004).

Clasificación taxonómica

Bacillus spp. se clasifica según Fritze (2004)

Reino Procariota

Phyllum: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Bacillaceae

Género: *Bacillus*

MATERIALES Y METODOS

Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Fitopatología y Microbiología del Departamento Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos

Se colectaron muestras de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de amarillamiento y marchitez de lotes comerciales del sur de Tamaulipas. Las muestras se lavaron con agua corriente para eliminar el suelo y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, las raíces se cortaron en pequeñas secciones de tejido necrosado, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3 % por 1 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre toallas de papel estéril para secarse. El tejido vegetal se depositó en cajas Petri con papa dextrosa agar (PDA) suplementado con 3 gr de extracto de malta y se incubó a 25°C por cinco días hasta obtener crecimiento micelial. Los diferentes aislamientos fueron observados en un microscopio estereoscopio, para su purificación se realizó a través de resiembras de punta de hifa, que se incubaron en las mismas condiciones mencionadas anteriormente por 48 a 72 horas.

Identificación taxonómica

Los aislamientos se identificaron por sus características morfológicas a nivel de especie (características del micelio, tipos esporas y características de las estructuras que conforman a los hongos), observándose a través de un microscopio compuesto bifocal Olympus CX41 y utilizando claves taxonómicas de Sneh, *et al.*, 1991; Leslie y Summerell, (2006); y Watanabe (2010).

Identificación molecular

El ADN de los hongos fue extraído por el método descrito por Velarde *et al.*, (2015), para realizarse su amplificación mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) de las regiones espaciadoras internas transcritas ITS1 e ITS4 de los genes ribosomales ADNr 18S utilizando el par de iniciadores de secuencia ITS1 R:5'- TCC GTA GGT GAA CCC TGC GG-3' e ITS4 D:5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3', por el método propuesto por O'Donnell *et al.*, (1998) y Geiser *et al.*, (2004). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, la secuenciación de los genes transcritos se realizó en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), San Luis Potosí, México. La búsqueda de similitud entre secuencias de ADN se realizó por medio del programa BLAST (Programa Informático de Alineamiento de Secuencias de Tipo Local) con el cual se compararon las secuencias de nucleótidos en estudio, con las bases de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información de Biotecnología) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de esta manera se identificaron los valores en homología para el aislamiento obtenido.

Pruebas de patogenicidad

De los cultivos puros de los hongos crecidos en cajas Petri con medio de cultivo PDA con extracto de malta, se inocularon plantulas de chile serrano de 10 cm de altura, las cuales fueron trasplantadas en vasos de plástico con capacidad de 300 gr de suelo estéril, se cortaron porciones de micelio con medio de cultivo con un sacabocado de 1 cm de diámetro y se colocaron en el sustrato junto a la raíz (Silva *et al.*, 2009). La severidad se evaluó con la escala descrita por Fernández *et al.*, (2004) en base al daño causado en la planta.

Pruebas preliminares de antagonismo

Se desarrollaron pruebas de antagonismo utilizando la metodología de cultivo dual, empleando cinco cepas identificadas como *Bacillus megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. liquefaciens* y dos cepas de *B. subtilis*, proporcionadas por el laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología. Las cepas se desarrollaron en cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA. Se utilizaron tres cepas de hongos fitopatógenos previamente identificados asociados a la marchites del chile *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Alternaria alternata*. Los bioensayos consistieron en colocar un explante del crecimiento activo del fitopatógeno al centro de una placa Petri con PDA, y en cada punto cardinal una azada de cada cepa bacteriana, además, se sembraron en cajas Petri explantes de los fitopatógenos como control negativo. El crecimiento radial del micelio se midió cada 24 h con un Vernier digital hasta que las cajas con el medio de cultivo de los controles (testigos) estaban llenas, esto con la finalidad de seleccionar las cuatro cepas con mejor actividad antagonista.

Bioensayos de antagonismo

El experimento se realizó con cuatro cepas de *Bacillus* que fueron seleccionadas de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas preliminares, al igual que las cepas de los hongos fitopatógenos, se realizó un arreglo factorial para la combinación de las cepas de *Bacillus* para colocarlos en cada punto cardinal, posteriormente se colocó un explante del crecimiento activo del fitopatógeno al centro de una placa Petri con PDA, y en cada punto cardinal una azada de la cepa bacteriana correspondiente de acuerdo al arreglo factorial, además se sembraron en cajas Petri explantes de los fitopatógenos como control negativo., se obtuvieron 10 tratamientos y un testigo por cada hongo fitopatógeno con cuatro repeticiones.

Diseño experimental

El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, procesando los resultados con análisis de varianza (ANVA) y la prueba de comparación de medias por Tukey ($P=0.05$) utilizando el programa estadístico R. version 3.3.1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica

A partir de explantes de plantas de chile serrano con síntomas de secadera se aislaron cuatro hongos, uno de estos aislamientos presentó macroconidias alargadas con extremidades estrechas con tres septos y microconidias sin septos (Fig. 1b), además de fialides cortas en formas de cabezas agrupadas (Fig. 1c), la tonalidad del micelio fue blanco al principio y después de 72 horas rosáceo, características típicas del *Fusarium oxysporum*. (Fig. 1) descrito por Leslie y Summerell (2006), estos resultados coinciden con lo reportado por Dueñas *et al.*, (2007) con aislamientos de *Fusarium* del cultivo de garbanzo, al igual que por Lezcano *et al.*, (2012), para *F. oxysporum* proveniente de *Leucaena leucocephala*.

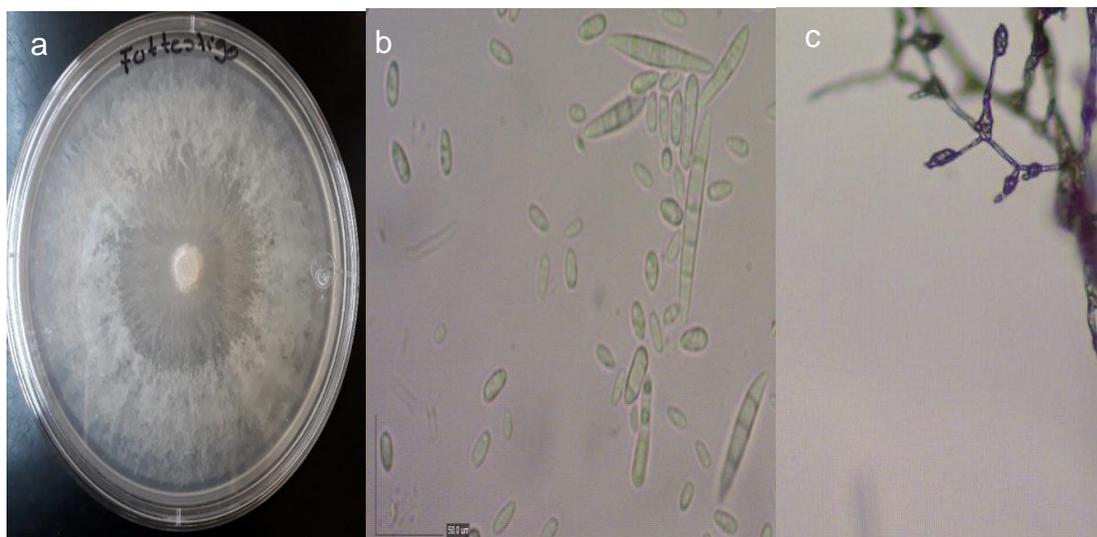


Figura 1. Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium oxysporum*., en medio PDA. a) Micelio blanco-rosáceo b) Macroconidias con tres septos y microconidias sin septos c) Fialides agrupadas.

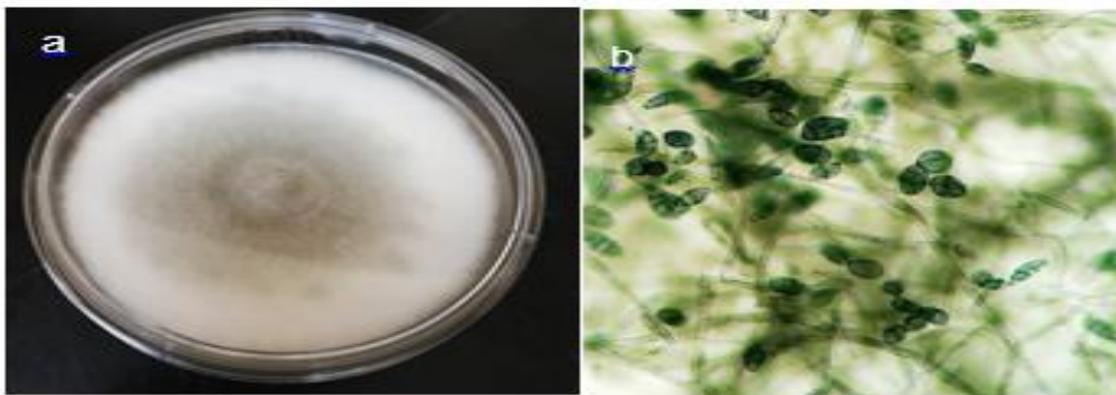


Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de *Alternaria alternata* en medio PDA. a) Micelio algodónoso blanco-grisaseo b) Conidias septadas y micelio.

Un cuarto aislado desarrolló crecimiento radial en forma de roseta de color blanco en el medio PDA, con micelio hialino y cenocítico, con clamidiosporas intercalares y esporangios terminales ovalados, reporta Watanabe (2010) morfometría para Oomycetes descritos en el genero *Mortierella* sp. Las características de esta cepa coinciden con lo reportado por Ramírez *et al.*, (2013) y Hernández *et al.*, (2018) con aislados del cultivo de caupi y aguacate.

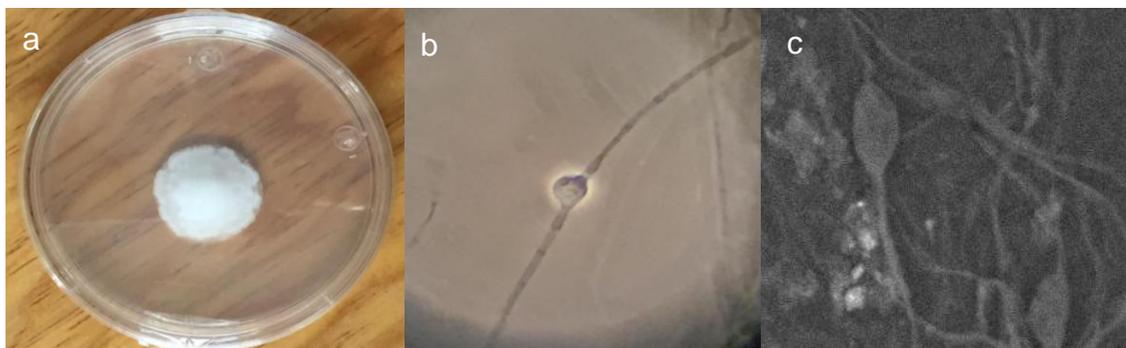


Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de *Mortierella* sp., en medio PDA. a) Crecimiento en forma de roseta de *Mortierella* sp. b) Clamidiospora intercalar c) Esporangio terminal.

Identificación molecular

De cada aislamiento de los hongos asociados a las plantas de Chile con secadera se extrajo el ADN y se amplificó los genes transcritos (ITS 1 e ITS 4) mediante la técnica de PCR, los que se muestran en la figura 5. Los productos amplificados se mandaron secuenciar al IPICYT, dando como resultado comparativo de dichas secuencias la identidad de la cepa 1 como *Fusarium oxysporum* con el 99% de similitud a partir de muestras de ADN extraído con 511 pb, con *Rhizoctonia solani* la cepa 2 se obtuvo el 100% de similitud con 953 pb, la cepa 3 con *Alternaria alternata* con el 96% con 715 pb y *Mortierella* sp., con 650 pb y 99% de similitud.

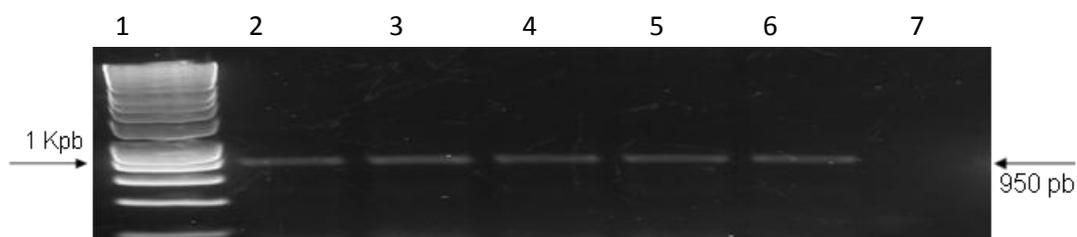


Figura 5. Gel de agarosa de productos de PCR obtenidos a partir de ADN de *F. oxysporum* carril 2, *R. solani* carril 3, *A. alternata* carril 4 y *Mortierella* sp., carril 5, testigo positivo carril 6 y testigo negativo sin ADN carril 7, utilizando ITS1 e ITS4.

Cuadro 1. Similitud molecular de cepas aisladas de plantas de Chile.

| Aislado ^w | Especie | Nucleótidos ^x | No de acceso ^y | IS ^z |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|
| Cepa 1 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 511 | KJ847727.1 | 99% |
| Cepa 2 | <i>Rhizoctonia solani</i> | 953 | KX592586.1 | 100% |
| Cepa 3 | <i>Alternaria alternata</i> | 715 | KX987252.1 | 96% |
| Cepa 4 | <i>Mortierella</i> sp. | 650 | MF423627.1 | 99% |

^w Clave otorgada por el autor ^x Número de nucleótidos de la secuencia comparada ^y índice de similitud de la secuencia comparada con la base de datos ^z Número de acceso en la base de datos del NCBI.

Pruebas de patogenicidad

15 días después de inocular las plantulas de chile con *F. oxysporum* presentaron ahorcamiento en la base del tallo, necrosis y marchitamiento, de igual forma, que las plantas inoculadas con *R. solani*, presentaron necrosis en la base del tallo y hojas amarillas (Fig 6). Los patógenos fueron aislados nuevamente para comprobar que estaban afectando a las plantas obteniendo crecimientos de color blanco-rosaceo que contenían macroconidias septadas y microconidias sin septos características de *F. oxysporum*, el segundo aislamiento se caracterizó por la coloración café además de hifas ramificadas en ángulo recto por lo que se identificó como *R. solani*.

Las plantas inoculadas con porciones de micelio con medio de cultivo de *Mortierella* sp., o *A. alternata* no presentaron síntomas de marchitez al igual que las plantas testigo. Resultados similares se observaron con cepas de *Mortierella* aislados de suelo de cultivo de manzano; en dicho estudio las cepas aisladas de *Mortierella* no fueron patogénicas (Mares *et al.*, 2017). A si mismo Velázquez *et al.*, (2009) observaron que *A. alternata* no se asocia como agente causal de la secadera de chile, si no como patógeno secundario.



Figura 6. Pruebas de patogenicidad en plantas de chile. a) Planta inoculada con *F. oxysporum* b) Planta inoculada con *R. solani* c) Plantas testigo.

Pruebas preliminares de antagonismo

La confrontación de diferentes especies de *Bacillus* spp. se presenta en el Cuadro 2; Al evaluar el efecto *in vitro* se encontró que *Bacillus subtilis* 1 y 2 son antagonistas similares con porcentajes de inhibición para *F. oxysporum* que van del 49.62% al 49.66% respectivamente, *B. amyloliquefaciens* y *B. megaterium* mostraron un efecto inhibitorio menor del 45.27% y 46.65%. Actividad antagónica de especies de *Bacillus* que coincide con los reportes de Méndez *et al.*, (2017).

Para *R. solani* las cepas de *B. subtilis* 1 y 2 inhibieron 41.67% y 39.55% seguidas por las cepas *B. megaterium* y *B. liquefaciens* con 34.43 % y 33.79 %, respectivamente. Esto concuerda con lo reportado por Asaka *et al.*, (1996) y Basurto *et al.*, (2010) quienes utilizaron a *B. subtilis* para el control de *R. solani*.

Para el control de *A. alternata*, las cepas *B. subtilis* 1 y 2 superaron el 50% de inhibición, las cepas *B. amyloliquefaciens* y *B. megaterium* obtuvieron 41.69% y 44.26% de inhibición. Estos resultados difieren en el grado de inhibición observado en todas las cepas de *Bacillus*, con los reportado por Mejía *et al.*, (2016) y Badia *et al.*, (2011.), quienes obtuvieron niveles de actividad antagónica de cepas de *Bacillus* del 90% y del 69% para el control de fitopatógenos como *Pyricularia grisea*, *Fusarium sp.*, y *A. Alternata*. Castillo *et al.*, (2015) utilizaron cepas de *Bacillus subtilis*, *B. pumilus* y *B. atrophaeus* presentando un efecto antagonista sobre la inhibición micelial de *R. solani* desde 40% a 67 %, resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo. Para realizar las mezclas sinérgicas se descartó a la cepa de *B. liquefaciens* debido a que al confrontarla con las cepas de fitopatógenos los niveles de inhibición fueron bajos y estadísticamente se encuentra en el último grupo.

Cuadro 2. Porcentajes de inhibición ocasionadas por diferentes cepas de *Bacillus spp.*, con fitopatógenos asociados a la secadera de Chile

| | <i>F.</i> <i>oxysporum</i> | <i>R.</i> <i>Solani</i> | <i>A.</i> <i>alternata</i> |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | 46.65 ab | 38.05 ab | 41.69 b |
| <i>B. subtilis 1</i> | 49.62 a | 41.67 a | 50.44 a |
| <i>B. subtilis 2</i> | 49.66 a | 39.55 a | 50.85 a |
| <i>B. megaterium</i> | 45.27 ab | 34.43 b | 44.26 b |
| <i>B. liquefaciens</i> | 41.63 b | 33.79 b | 34.53 c |

Bioensayos de mezclas de cepas de *Bacillus spp.*

La mezcla de antagonistas reportan diferentes grados de inhibición hacia el crecimiento micelial de los hongos (Fig. 7), algunos porcentajes son superiores, al uso individual de cada especie en confrontaciones duales en placas de ensayo (Cuadro 3). Se observó que los mejores resultados de inhibición para *F. oxysporum* fueron con la mezcla *B. megaterium*- *B. amyloliquefaciens*- *B. subtilis 1* con 55.60% de inhibición, este resultado fue mayor a los porcentajes de las pruebas testigo donde *B. subtilis 1* que inhibió 49.62 %, *B. amyloliquefaciens* 46.65 % y *B. megaterium* 45.28 %. Sin embargo Zhang *et al.*, (2009) encontraron rangos de control *in vitro* de *F. oxysporum* por *B. subtilis* que van del 17% al 48%, resultados menores a los obtenidos en este trabajo donde se obtuvo hasta el 55.38 % de inhibición, en mezclas de especies de *Bacillus* antagonísticos.

El fitopatógeno *R. solani* fue susceptible a las mezclas antagonistas conformadas por tres cepas de *Bacillus*, el mayor porcentaje de inhibición representa el 57.96% proporcionado por la combinación *B. megaterium*- *B. amyloliquefaciens*- *B. subtilis 1* seguida por *B. megaterium*-*B. subtilis 2*-*B. amyloliquefaciens* con 56.40%, posteriormente 54.52% por *B. megaterium*-*B. subtilis 1*- *B. subtilis 2*, estas mezclas se agruparon estadísticamente iguales; El grado de inhibición para los testigos se encuentra entre 34.44% al 38.05%, los

resultados de las combinaciones así como los testigos son menores a los señalados por Hernández *et al.*, (2018) que reportan el 66.26% de inhibición confrontando a *B. subtilis* contra *R. solani*. Lagunas *et al.*, (2001) mencionan que cepas de la misma especie pueden manifestar diferentes niveles de inhibición hacia el crecimiento de diferentes microorganismos.

La mezcla que proporcionó un efecto inhibitorio en mayor porcentaje al fitopatógeno *A. alternata* fue *B. megaterium*- *B. subtilis* 2-*B. amyloliquefaciens*, con el 56.05%, los testigos se encuentran en grupos estadísticos diferentes con porcentajes que van del 41.70% al 50.85% de inhibición. Méndez *et al.*, (2017) reportan un efecto inhibitorio del 90% al 100% de dos cepas de *Bacillus* para el control de *A. alternata*. Souto *et al.*, (2004), mencionan que el efecto de *Bacillus* en el control de patógenos se relaciona a la producción de compuestos peptídicos y lipopeptídicos como las micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, fungistatinas, etc., estudios realizados por Sosa *et al.*, (2005); Corrales *et al.*, (2011) que demuestran que estos compuestos son eficientes para anular el crecimiento de patógenos *in vitro* o en condiciones de campo, Tlapal *et al.*, (2014) explican que la combinación de microorganismos crea un ambiente de equilibrio en el medio que evita que las poblaciones de los fitopatógenos se disparen.

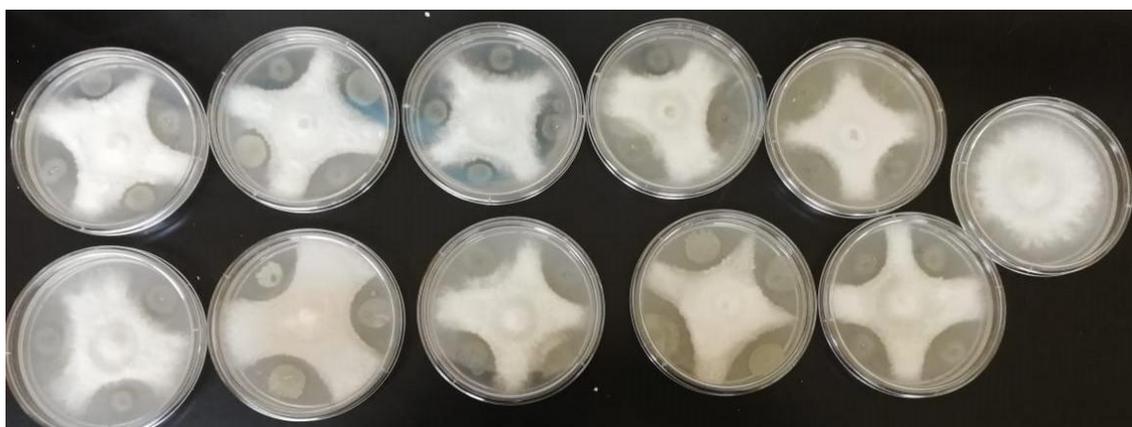


Figura 7. Bioensayo de inhibición por *Bacillus* spp contra *F. oxysporum*.

Cuadro 3. Porcentajes de inhibición ocasionadas por mezclas de cepas de *Bacillus spp.* ante fitopatógenos asociados a la secadera de Chile.

| No. de mezcla | Antagonistas | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Alternaría alternata</i> |
|---------------|--|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> | 49.44 bc | 43.89 b | 52.29 ab |
| 2 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. subtilis 1</i> | 47.34 c | 44.12 b | 47.07 bcd |
| 3 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. subtilis 2</i> | 48.39 c | 41.22 bc | 47.94 bcd |
| 4 | <i>B. subtilis 1</i> - <i>B. subtilis 2</i> | 45.28 c | 44.18 b | 45.30 bcd |
| 5 | <i>B. subtilis 1</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> | 48.45 c | 42.87 bc | 51.00 abc |
| 6 | <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>B. subtilis 2</i> | 48.33 c | 41.79 bc | 47.59 bcd |
| 7 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. subtilis 2</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> | 54.57 ab | 56.40 a | 56.05 a |
| 8 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. subtilis 1</i> - <i>B. subtilis 2</i> | 48.42 c | 54.52 a | 50.51 abc |
| 9 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>B. subtilis 1</i> | 55.60 a | 57.96 a | 50.56 abc |
| 10 | <i>B. megaterium</i> - <i>B. subtilis 2</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>B. subtilis 1</i> | 46.11 c | 53.33 a | 52.25 ab |
| Testigo 1 | <i>B. amyloliquefaciens</i> | 46.65 c | 38.05 cd | 41.70 d |
| Testigo 2 | <i>B. subtilis 1</i> | 49.62 bc | 41.68 bc | 50.44. abc |
| Testigo 3 | <i>B. subtilis 2</i> | 49.67 bc | 39.56 bcd | 50.85 abc |
| Testigo 4 | <i>B. megaterium</i> | 45.28 c | 34.44 d | 44.27. cd |

CONCLUSIONES

Se aisló e identificó morfológica y molecularmente a *F. oxysporum*, *R. solani*, como fitopatógenos asociados a la marchitez del chile y se comprobó su patogenicidad. También fueron identificados *A. alternata* y *Mortierella* sp., asociados al cultivo sin embargo no fueron patogénicos para plantas de Chile.

La combinación *in vitro* de especies de *Bacillus* incrementa los porcentajes de antagonismo para el control de los fitopatógenos asociados a la secadera de Chile.

Se realiza el primer reporte de la presencia de *Mortierella* sp. asociada a raíces de plantas de Chile y particularmente para zonas productoras de este cultivo en Tamaulipas, México.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N., Plant Pathology. San Diego, California: Editorial Elsevier Academic Press, 2005.
- AGUILAR-RINCON, V. H., T. Corona-Torres, P. López-López, L. Latournerie-Moreno, M. Ramírez-Meraz, H. Villalón- Mendoza. And J. A. Aguilar-Castillo. Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, COLPOS, INIFAP, ITConkal, UANL, UAN. México 2010. 114.
- AGUIRRE-MANCILLA, C. L., *et al.* El chile (*C. annum* L.), cultivo y producción de semilla [online]. Ciencia y Tecnol. Agrop México. 2017 vol. 5. 1: 19-31. [viewed 18 June 2018].
- AKGÜL, D. S., *et al.* Biocontrol of *Phytophthora capsici* pepper plants by *Bacillus megaterium* strains [online]. Plant Pathology. 2008, vol. 90. 29-34 [viewed 6 November 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v90i1.588>
- ALONSO, R. A., *et al.* Evaluación *In Situ* de la variabilidad genética de los chiles silvestres (*Capsicum* spp.) en la región Frailesca del estado de Chiapas, México [online]. Cultivos Tropicales. 2008, vol 29.2 49-55. [viewed 12 March 2019].
- ANAYA-LÓPEZ, J. L., *et al.* Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez [online]. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 2011, vol 2.3 373-383. [viewed 10 March 2019].
- ASAKA, O., Biocontrol of *Rhizoctonia solani* dampingoff of tomato with *Bacillus subtilis* RB14 [online] Appl Environ Microbiol. 1996, vol 62:4081-4085. [viewed 9 November 2018]
- BADIA, M. R., *et al.* Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) [online]. Revista Brasileira de Agroecología. 2011, vol 6. 90-99. [viewed 9 November 2018]
- BASHA, S. *et al.* Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current Scienc. 2002, vol 82.1457-1463. [viewed 2 November 2018]
- BASURTO, M. G., *et al.* Cambios en la estructura celular durante la actividad antagonica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides* [online]. Acta Microscopica. 2010, vol 19. 138-144. [viewed 2 March 2019].

- CARLING, D.E., *et al.* Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani* [online]. *Phytopathology*. 2002, vol 92 893-899. [viewed 2 March 2019]. Available from: 10.1094/PHYTO.2002.92.8
- CARMONA, M., *et al.* La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. Causas y efectos en cultivos extensivos [online]. *Revista Facultad de Agronomía UBA Agronomía y ambiente*. 2017, vol 37.1 1-19. [viewed 2 March 2019].
- CALVO, P., *et al.* Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*) [online]. *Ecología Aplicada*. 2010, vol 9.1. [viewed 26 May 2019].
- CHEW, M. Y. I., P. A. Vega., R. M. Palomo and D. F Jiménez. Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). INIFAP-Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental, La Laguna. 2008, 153-2.
- CHOUDHARY, D. K., *et al.* Interactions of *Bacillus* spp. and plants-UIT special reference to induced systemic resistance (ISR) [online]. *Microbiological Research*. 2009, vol 164 493-513. [viewed 26 May 2019].
- CORRALES, L., *et al.* Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L [online]. *Revista Ciencias Biomédica*. 2011, vol 8.13 63-75. [viewed 26 May 2019].
- DAI, Z.C., *et al.* Different Growth Promoting Effects of Endophytic Bacteria on Invasive and Native Clonal Plants [online]. *Frontiers in Plant Science*. 2016, vol 7. 706 1-9. [viewed 25 May 2019]. Available from: 10.3389/fpls.2016.00706.
- DAUGOVISH, O, R. Smith, M. Cahn, S. Koike, H. Smith, J Aguilar, C. Quiros, M. Cantwell, and E. Takele. Celery production in California. The Regents Division of Agriculture and Natural Resources, University of California. Publication 2008. 7220:4.
- DUEÑAS, G. J., *et al* Caracterización de especies del género *Fusarium* en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum*) en las provincias Ciudad Habana y la Habana [online]. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 2007, vol 11.32 63-66. [viewed 25 May 2019]
- FERNÁNDEZ, S.P., *et al.* Characterization of Southern New México *Phytophthora capsici* Leonian Isolates from Pepper (*Capsicum annuum* L.) [online]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2004, vol 22. 82-89. [viewed 15 June 2019].

- FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria [online]. *Phytopathology*. 2004, vol. 94.11 1245-1248 [viewed 2 November 2018]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>.
- GARCÍA, R. S., *et al.* Marchitez bacteriana en Chile causada por *Erwinia carotovora* sub spp [online]. *Carotovora. Revista Mexicana de Fitopatología*. 2000, vol 18:120-124. [viewed 18 May 2019]
- GEISER, D. M., *et al.* *Fusarium-ID v. 1.0*: a DNA sequence database for identifying *Fusarium* [online]. *European Journal of Plant Pathology*. 2004, vol 110.473-479. [viewed 10 July 2018].
- GONZÁLEZ-CHAVIRA, M. M., *et al.* Guía para el manejo de la marchitez del Chile en Guanajuato. Prometeo editores S. A de C. V. 2009.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, V., *et al.* Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia* [online]. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2006, vol 4.1 55-79. [viewed 5 May 2019]. Available from: 10.5424/sjar/2006041-178
- GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, D. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn [online]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2002, vol 20.2 200-205. [viewed 25 March 2019].
- GOUR, R. Isolation and characterization of Actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* [online]. *Adv. J. Pharm. Sci.* 2012, vol 1.2 31-30. [viewed 25 May 2019].
- GROENEWALD, S. Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Pretoria. Sudáfrica [online]. 2006. [viewed 2 March 2019]. Available from: <http://hdl.handle.net/2263/30587>.
- GUIGÓN-LÓPEZ, C., *et al.* Estudio regional de las enfermedades del Chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el Sur de Chihuahua, México [online]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2001, vol 19. 49-56. [viewed 10 March 2019].
- GUO, S., *et al.* Whole genome sequencing of *Bacillus subtilis* XF-1 reveals mechanisms for biological control and multiple beneficial properties in plants [online]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015, vol 42. 925-937. [viewed 6 July 2018]. Available from: 10.1007/s10295-015-1612-y.
- HARMAN, G. E., *et al.* Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world [online]. *Plant Disease*. 2010, vol 94.8 928-939. [viewed 5 May 2019].

- HERNÁNDEZ, P. A., *et al.* Primer reporte de *Mortierella elongata* como patógeno del cultivo del aguacate en Michoacán, México [online]. *Scientia Fungorum*. 2018, vol 48: 95-98. [viewed 11 May 2019].
- Hernández P. D., *et al.* Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales [online]. *Revista Centro Agrícola*. 2018, vol 45.2. [viewed 5 May 2019].
- HO, S.Y., *et al.* Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of the fungus *Mortierella alpina* isolated from Soil [online]. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*. 2007, vol 55. 3960-3966. [viewed 5 May 2019]. Available from: 10.1021/jf0700071
- HU, Z., *et al.* Down regulation of *Fusarium oxysporum* endogenous genes by Host Delivered RNA interference enhances disease resistance [online]. *Frontiers in Chemistry*. 2015, vol 3.1 1-10. [viewed 5 May 2019]. Available from: doi: 10.3389/fchem.2015.00001.
- INFANTE, D., *et al.* Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos [online]. *Revista Protección Vegetal*. 2009, vol 24.1 14-21. [viewed 15 March 2019].
- KIRK P. M., P. F. CANNON, D. W. MINTER Y J. A. STALPERS. AINSWORTH AND BISBY'S. Dictionary of the fungi. 10th ed. Wallingford: CAB International. 2008.
- LAGUNAS, L. J., *et al.* *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [online]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2001, vol 19.1 57-65. [viewed 15 March 2019].
- LEZCANO JC, *et al.* Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv [online]. *Perú almacenadas. Pastos y Forrajes*. 2012, vol 35.2 187-196. [viewed 15 March 2019].
- LOZANO, A. N., *et al.* Etiología y evaluación de alternativas de control de la marchitez del chile de árbol (*Capsicum annum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México [online]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2015, vol. 33. 1. [viewed 14 December 2018].
- MAGET, D. R., *et al.* Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A.[online]. *Biochimie*. 1992, vol 74 1047.105. [viewed 5 March 2019]

- MÉNDEZ, Ú. J., *et al.* Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos [online]. Revista científica Nexo. 2017, vol 30.2 96-110. [viewed 15 March 2019]. Available from: <http://dx.doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>
- MICHIELSE, C; *et al.* Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum* [online]. Molecular Plant Pathology. 2009, vol 10.3 311-324. [viewed 15 March 2019]. Available from: [10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x).
- MOJICA-MARÍN V., Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis* [online]. FYTON. 2009, vol. 78. 105-110 [viewed 18 December 2018].
- OARD, S., *et al.* Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Microbiology. 2004, vol 97 169–180. [viewed 4 May 2019].
- O'DONNELL, K., *et al.* Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies [online]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1998, vol 95. 2044–2049. [viewed 10 July 2018]. Available from: [10.1073/pnas.95.5.2044](https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2044)
- Ongena, M., *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants [online]. Environ. Microbiol. 2007, vol 9 1084-1090. [viewed 4 December 2018].
- ORBERÁ, R. T. *et al.* Aislamiento de cepas del genero *Bacillus* sp. Con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal [online]. Revista Cubana de Química. 2005, Vol. 17.1. [viewed 25 May 2019].
- PALMA, M. E., *et al.* Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. En líneas de Chile Huacle (*Capsicum annum* L.) [online]. Revista Fitotecnia Mexicana. 2017, vol. 40. 359-363. [viewed 14 December 2018].
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol [online]. Annual Review of Phytopathology. 1985, vol 23.23-54. [viewed 29 March 2019]. Available from: [10.1146/annurev.py.23.090185.000323](https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323)
- PARVATHI, A., *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India [online]. Brazilian Journal of Microbiology. 2009, vol 40.269-275. [viewed 12 March 2019]. Available from: [10.1590/S1517-838220090002000012](https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000012)

- PÉREZ-ACEVEDO, C. E. *et al.* Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca [online]. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2017, vol. 8. 2. [viewed 12 March 2019].
- PÉREZ, M. L., *et al.* Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamiento de *Phytophthora capsici* Leo [online]. Revista Mexicana de Fitopatología. 2003, vol 21 19-23. [viewed 4 May 2019].
- RAMÍREZ GIL J., *et al.* Alternativas Microbiológicas para Mejorar el Crecimiento del Cauquí [online]. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín. 2013, vol 66.2 7035-7044. [viewed 4 May 2019].
- RAYAROTH, A., *et al.* Arachidonic acid synthesis in *Mortierella alpina*: Origin, evolution and advancements [online]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences. 2017, vol 87 1053-1066. [viewed 24 May 2019]. Available from: 10.1007/s40011-016-0714-2
- RUBIO, R. G., *et al.* Resistencia in vitro de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP [online]. REBIOL. 2008, vol. 28:2 [viewed 11 June 2018].
- SAMANIEGO-GÁMEZ, B., *et al.* Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. [online]. Revista Protección Vegetal. 2017, vol 32.1. [viewed 6 June 2019].
- SARTI, G., *et al.* Actividad anti fúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con Bradyrhizobium japonicum [online]. Agrociencia. 2013, vol 47. 373-383. [viewed 4 March 2019].
- SIAP (2017) Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consulta: 30 abril 2019. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SILVA, H.V., *et al.* Distribución Espacio Temporal de la Marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e Identificación del Agente Causal *Phytophthora capsici* Leo [online]. Revista mexicana de fitopatología. 2009, vol 27. 2. [viewed 25 March 2019].
- SIMMONS, E.G. 2007. Alternaria: an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- SOSA, A., *et al.* Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco [online]. Centro Agrícola. 2005, vol 32.3 25-29. [viewed 25 March 2019].

- SOUTO, G., *et al.* Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds [online]. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, vol 1247-1256. [viewed 5 June 2019].
- TUN, DZUL, J. C., chile habanero características y tecnología de producción. Folleto técnico. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de investigación Regional Sureste. 2001. Mocochoá, Yucatán, México.
- USDA (2019) U.S. National Plant Germplasm System 2019. Consulta: 15 marzo 2019. Disponible en: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?8904>
- VALADEZ L. A. Producción de hortalizas. México, Distrito, Federal: Editorial LIMUSA, 1989.
- VELARDE, F. S., *et al.* Identificación molecular y biológica de las razas 0 y 5 de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato del garbanzo en el noroeste de México [online]. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2015, vol 6. 735-748. [viewed 20 May 2018].
- VELASQUEZ V. R. *et al.* Necrosis foliar; nuevo síntoma asociado a la pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum*) en Durango y Zacatecas, México [online]. *Scientia Fungorum*. 2017, vol 46, 47-53. [viewed 5 June 2019].
- VELÁSQUEZ, V. R., *et al.* Sintomatología y Géneros de Patógenos Asociados con las Pudriciones de la Raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México [online]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2001, vol. 19:2 [viewed 11 June 2018].
- VERA-Sánchez, K. S, J. Cadena-Iñiguez, L. Latournerie-Moreno, J. F. Santiaguillo-Hernández, A. Rodríguez-Contreras, F. A. Basurto-Pena, D. Castro-Lara, E. Rodríguez-Guzmán, P. López- López, And E. Ríos-Santos. Conservación y utilización sostenible de las Hortalizas Nativas de México. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas 2016. 132
- WELLER, D.M. Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria [online]. *Annual Review of Phytopathology*. 1988, Vol. 26 379-407. [viewed 2 June 2019].
- YADAV, D.R., *et al.* First report of *Mortierella alpina* (*Mortierellaceae*, *Zygomycota*) isolated from crop field soil in Korea [online]. *Mycobiology*. 2014, vol 42 401-404. [viewed 25 May 2019]. Available from: <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.203>