



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
Unidad Michoacán

**ANTAGONISMO DE RIZOBACTERIAS CONTRA
Phytophthora capsici Y EFECTO DE *Bacillus subtilis* EN
CHILE (*Capsicum annum* L.) INFECTADO CON EL
OOMICETO**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestro(a) en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

PRESENTA:

José Luis Ávila Oviedo

Director(es) de tesis:

Dr. Carlos Méndez Inocencio

Dr. Edgar Villar Luna

Jiquilpan, Michoacán, diciembre del 2022



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México de del

El Colegio de Profesores de Posgrado de en su Sesión
(Unidad Académica)

Extraordinaria No. celebrada el día del mes de conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	ÁVILA	Apellido Materno:	OVIEDO	Nombre (s):	JOSÉ LUIS
-------------------	-------	-------------------	--------	-------------	-----------

Número de registro:

del Programa Académico de Posgrado:

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Objetivo general del trabajo de tesis:

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: 2° Director:
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dr. Carlos Méndez Inocencio

2° Director de Tesis (en su caso)

Dr. Edgar Villar Luna

Aspirante

José Luis Ávila Oviedo

Presidente del Colegio

Dra. María Valentina Angoa Pérez



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U. MICHOACÁN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: para examinar la tesis titulada:

del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Ávila	Apellido Materno:	Oviedo	Nombre (s):	José Luis
--------------------------	-------	--------------------------	--------	--------------------	-----------

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 37 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI NO SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*
El porcentaje de similitud es congruente, por el uso de fuentes bibliográficas de manera correcta, que son utilizados por otros autores. Necesarios para contrastar la información obtenida. Es un trabajo que versa sobre temas de importancia nacional y mundial.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR SUSPENDER NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD o MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

El trabajo de tesis cumple con los objetivos de investigación planteados al inicio y durante el trabajo de interacción con el alumno y las sugerencias del comité asesor. Además, que contribuye con la generación de conocimiento básico.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Dr. Carlos Méndez Inocencio
Director de Tesis
Nombre completo y firma

Dra. María Valentina Angoa Pérez
Nombre completo y firma

M. en C. Ignacio García Ruiz
Nombre completo y firma

Dr. Edgar Villar Luna
2° Director de Tesis (en su caso)
Nombre completo y firma

Dr. Mauricio Nahum Chávez Avilés
Nombre completo y firma

Dra. María Valentina Angoa Pérez
Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
COMITÉ INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U. MICH.



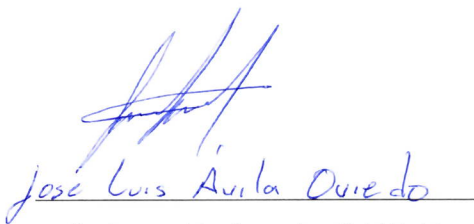
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día 08 del mes de noviembre del año 2022, el (la) que suscribe **JOSÉ LUIS ÁVILA OVIEDO** alumno(a) del programa **MAESTRIA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE** con número de registro **B200564**, adscrito(a) a **CIIDIR-IPN-UNIDAD MICHOACÁN** manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de **DR. CARLOS MENDEZ INOCENCIO** y **DR. EDGAR VILLAR LUNA** y cede los derechos del trabajo intitulado **ANTAGONISMO DE RIZOBACTERIAS CONTRA *Phytophthora capsici* Y EFECTO DE *Bacillus subtilis* EN CHILE (*Capsicum annuum* L.) INFECTADO CON EL OOMICETO**, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o director(es). Este puede ser obtenido escribiendo a las siguiente(s) dirección(es) de correo. evillar@ipn.mx, cmendezi@ipn.mx, jo.se.lu.is_95@outlook.com. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Handwritten signature of José Luis Ávila Oviedo in blue ink.

Nombre completo y firma autográfica del (de la)
estudiante

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional, a través del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN. Michoacán), por darme la oportunidad de ingresar a su programa de posgrado y de esta manera poder realizar mis estudios de maestría.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por proporcionar el apoyo económico para que fuera posible desarrollar el proyecto “Antagonismo de rizobacterias contra *Phytophthora capsici* y efecto de *Bacillus subtilis* en chile (*Capsicum annum* L.) infectado con el oomiceto”.

Al programa de becas de estímulo institucional de formación de investigadores (BEIFI), por la oportunidad de complementar mi formación académica y, el apoyo económico otorgado.

A mis asesores el Dr. Edgar Villar Luna y Dr. Carlos Mendez Inocencio, por otorgarme la oportunidad de desarrollar el presente proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Dedico todo el esfuerzo de este trabajo a mi padre, José Luis Ávila Montero. Por ser un ejemplo de vida e inculcarme el valor del trabajo, por siempre tener la convicción de guiarme hacia el camino del conocimiento, por todos los años de amor y sacrificio brindados.

A mi madre, María del Carmen Oviedo Oviedo, por darme fuerza para continuar en momento de incertidumbre, por no dejar de creer en mí, y por no permitir que me diera por vencido, gracias a su amor, consejos y atenciones este objetivo se ha concluido.

A mi compañera Lucia Albor Guerrero, por todo el cariño brindado, por su paciencia y comprensión cuando nos hemos tenido que distanciar. Por ser siempre una motivación para continuar mejorando en el aspecto personal y profesional.

A mi amigo Mauricio N. Chávez Avilés, por tantos años de amistad, por su apoyo incondicional en momentos difíciles, por las aportaciones hacia mi crecimiento personal y profesional y por ser una pieza fundamental para la realización de este posgrado,

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
Capítulo I. Revisión de literatura.....	5
1.1 Cultivo de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.)	5
1.1.1 Generalidades.....	5
1.1.2 Importancia económica y cultural de <i>C. annuum</i>	7
1.1.3 Principales enfermedades que afectan al cultivo de chile	8
1.2 <i>Phytophthora capsici</i>	8
1.2.1 Generalidades del oomiceto	8
1.2.3 Ciclo de vida de <i>P. capsici</i>	9
1.3 Métodos de control de <i>P. capsici</i>	11
1.3.1 Control cultural	11
1.3.2 Control químico.....	12
1.3.3 Estrategias de control biológico	12
1.3.3.1 Bacterias como agentes de biocontrol de <i>P. capsici</i>	13
1.3.3.2 Mecanismo de antibiosis en bacterias	14
1.4 Mecanismos de defensa bioquímica en chile contra <i>P. capsici</i>	15
1.4.1 Resistencia sistémica adquirida.....	16
1.4.2 Resistencia sistémica inducida	18
1.5 Referencias.....	21
CAPÍTULO II. Antagonismo <i>in vitro</i> de aislados bacterianos contra <i>Phytophthora capsici</i>	32
2.1 Introducción	32
2.2 Materiales y métodos	34
2.2.1 Material microbiológico.....	34
2.2.2 Determinación del efecto antagonista de las bacterias contra <i>P. capsici</i>	34
2.2.2.1 Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>P. capsici</i>	35
2.2.2.2 Alteraciones morfológicas del micelio.....	35
2.2.2.3 Cuantificación y morfometría de esporangios.....	35
2.2.2.4 Patogenicidad de <i>P. capsici</i> en plantas de chile	35
2.2.3 Análisis estadístico.....	36

2.3 Resultados	38
2.3.1 Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento micelial de <i>P. capsici</i>	38
2.3.2 Alteraciones morfológicas del micelio, y morfometría de esporangios de <i>P. capsici</i>	39
2.3.3. Patogenicidad de cepas de <i>P. capsici</i> confrontadas con las bacterias en plantas de chile....	42
2.4 Discusión.....	49
2.5 Conclusión.....	53
2.6 Referencias.....	54

CAPÍTULO III. Respuesta de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) a la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Phytophthora capsici*.....59

3.1 Introducción	59
3.2 Materiales y métodos	62
3.2.1 Severidad inducida por <i>P. capsici</i> en plantas de chile bacterizadas	62
3.2.1.1 Material microbiológico.....	62
3.2.1.2 Material vegetal e inoculación	62
3.2.4. Diseño experimental y variables evaluadas.....	63
3.2.5 Expresión de genes de defensa en plantas de chile cv. C. wonder bacterizadas	64
3.2.5.1 Material vegetal e inoculación	64
3.2.6. Diseño experimental y variables evaluadas.....	65
3.2.5.1 Extracción de RNA	65
3.2.5.2 Síntesis de cDNA	65
3.2.5.3 PCR en tiempo real	66
3.2.6 Análisis estadístico.....	67
3.3 Resultados	68
3.3.1 Severidad de <i>P. capsici</i> en plantas de chile cv. C. wonder inoculadas con las bacterias	68
3.3.2 Expresión de genes de defensa en plantas de chile cv. C. wonder inoculadas con <i>B. subtilis</i> y <i>P. capsici</i>	69
3.4 Discusión.....	72
3.5 Conclusión.....	76
3.6 Referencias.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis filogenético de Capsicum y agrupamiento de las especies de acuerdo a los grupos identificados (Carrizo-García, 2018).....	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>P. capsici</i> y sus diferentes estadios de infección (elaboración con Biorender).....	11
Figura 3. Respuesta sistémica inducida y adquirida (elaboración con Biorender).....	16
Figura 4. Efecto antagónico <i>in vitro</i> de las bacterias sobre <i>Phytophthora capsici</i>	39
Figura 5. Alteraciones morfológicas de las hifas de <i>P. capsici</i> a cuatro días posteriores a la confrontación con las bacterias.....	40
Figura 6. Efecto de las bacterias sobre la producción de esporangios en <i>P. capsici</i> a los 4 días postconfrontación.	41
Figura 7. Efecto de las bacterias en la morfología de esporangios de <i>P. capsici</i>	42
Figura 8. Severidad de <i>P. capsici</i> previamente confrontado con las bacterias.....	44
Figura 9. Efecto de <i>P. capsici</i> bacterizado en plantas de chile cv. C. Wonder..	47
Figura 11. Acumulación relativa de genes asociados con patogénesis en raíces de plantas de C. wonder inoculadas con <i>B. subtilis</i> e infectadas con zoosporas de <i>P. capsici</i>	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Severidad inducida por <i>P. capsici</i> en hojas de chile (cv. California Wonder).....	45
Tabla 2. Supervivencia de las plantas de chile (cv. California Wonder) infectadas con micelio de <i>P. capsici</i> (previamente confrontado con las bacterias)	48
Tabla 3. Escala de severidad en cv. C. wonder	64
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de expresión génica.....	67
Tabla 5. Severidad inducida por <i>P. capsici</i> en plantas de chile bacterizadas.....	69

RESUMEN

Phytophthora capsici es uno de los patógenos más persistentes en cultivos de chile (*Capsicum annuum* L.), el cual ocasiona la enfermedad de la marchitez o tizón tardío; como consecuencia se generan bajos rendimientos. Una alternativa sustentable de control del patógeno comprende aprovechar los diferentes mecanismos de antagonismo de bacterias benéficas. En el capítulo dos del presente trabajo se evaluó el efecto *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus* sp. (BMBH), *B. subtilis* (BMBA), *B. amyloliquefaciens* (BMBC), *Paenibacillus* sp. (BMBP) y *Pseudomonas putida* (BMBI) sobre *P. capsici* (Pc) y, posteriormente en el capítulo tres, se determinó el efecto que tienen estas mismas bacterias en la protección de la enfermedad por *P. capsici* mediante la expresión de genes involucrados en la respuesta sistémica en *C. annuum* var *California wonder*. En los ensayos de confrontación *in vitro* (capítulo 2), se observó que *Bacillus* sp. (BMBH/Pc) y *Pseudomonas putida* (BMBI/Pc) alteraron la morfología del micelio del fitopatógeno, estas alteraciones incluyeron bordes irregulares y melanización, así como la promoción del crecimiento radial 15.72 ± 5.34 % y 11.01 ± 3.021 % respectivamente, en contraste; *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) y *B. subtilis* (BMBP/Pc) inhibieron el crecimiento radial en un 41.46 ± 1.61 % y 53.96 ± 1.62 %, correspondientemente. Adicionalmente, *Bacillus* sp. (BMBH/Pc) generó un incremento en la producción de estructuras infectivas (393 ± 72.26 esporangios), por el contrario *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) y *B. subtilis* (BMBA/Pc) generaron un declive en la producción de esporangios (37 ± 1.49 y 1 ± 0.73) respectivamente, además *B. subtilis* (BMBH/Pc) afectó la morfología de los esporangios (menor longitud 24.29 ± 1.09 μm y anchura 24.29 ± 1.09 μm) con respecto al tratamiento control. Al evaluar la severidad de *P. capsici* en hojas desprendidas de *C. wonder* (capítulo 3), al día ocho, las colonias previamente confrontadas con *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) y *B. subtilis* (BMBA/Pc) mantuvieron valores bajos de infección (1.5 ± 0.30 y 0 ± 0.30 respectivamente), de igual forma el micelio de estas colonias patógenas y las confrontadas con *P. putida* (BMBI/Pc) no lograron infectar plantas de *C. wonder*. Al evaluar el efecto protector de las bacterias *in vivo* en plantas de *C. wonder* únicamente *B. subtilis* (CW+BMBA+Pc), generó un retraso en la infección por *P. capsici* al día 14 (5.0 ± 0.44) (capítulo 3). En cuanto a la determinación de la expresión de los genes dependientes de la vía del ácido salicílico (*PR1*, *PR5*) y *EAS*, todos los genes se sobren expresaron a las 8 horas en presencia de *P. capsici* (CW+Pc). Sin embargo, únicamente *PR1* y *EAS* mantuvieron su sobreexpresión a las 24 h, estos mismos genes se expresaron de manera

permanente con niveles bajos en las plantas que se inocularon únicamente con *B. subtilis* (CW+BMBH+Pc), lo cual indica su participación en la respuesta sistémica, inducida por *B. subtilis*, por lo tanto; se determinó que *B. subtilis* posee la capacidad de suprimir el crecimiento y desarrollo de *P. capsici in vitro* y genera un retraso *in vivo* de la infección por este mismo fitopatógeno.

Palabras clave: *Antagonismo, severidad, sobreexpresión, respuesta sistémica inducida*

ABSTRACT

Phytophthora capsici is one of the most persistent pathogens in *Capsicum annuum* L. crops, due it caused late blight and wilting disease, consequently, low productivity and economic yields are generated. A sustainable control alternative for the pathogen consists of taking advantage of the different mechanisms of antagonism of beneficial bacteria. In chapter 2 of this work, the *in vitro* and *in vivo* effect of *Bacillus* sp. (BMBH), *B. subtilis* (BMBA), *B. amyloliquefaciens* (BMBC), *Paenibacillus* sp. (BMBP) and *Pseudomonas putida* (BMBI) against *P. capsici* (Pc). Subsequently in chapter 3, the effect of these same bacteria in protecting against *P. capsici* disease was evaluated through the expression of genes involved in the systemic response in *C. annuum* var California wonder. In the *in vitro* confrontational essays (chapter 2), it was observed that *Bacillus* sp. (BMBH/Pc) and *Pseudomonas putida* (BMBI/Pc) altered the morphology of the mycelium of the phytopathogen these alterations included irregular borders and melanization, as well as the promotion of radial growth $15.72 \pm 5.34\%$ and $11.01 \pm 3.021\%$ respectively. In contrast, *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) y *B. subtilis* (BMBP/Pc) inhibited radial growth by $41.46 \pm 1.61\%$ and $53.96 \pm 1.62\%$, correspondingly. Additionally, *Bacillus* sp. (BMBH/Pc) generated an increase in the production of infective structures (393 ± 72.26 sporangia), on the contrary *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) and *B. subtilis* (BMBA/Pc) generated a decline in the production of sporangia (37 ± 1.49 and 1 ± 0.73) respectively, in addition, *B. subtilis* (BMBH/Pc) affected the morphology of the sporangia (shorter length $24.29 \pm 1.09 \mu\text{m}$ and width $24.29 \pm 1.09 \mu\text{m}$) with respect to the control treatment. When evaluating the severity of *P. capsici* in detached leaves of C. wonder (chapter 3), on day eight, the colonies previously confronted with *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) and *B. subtilis* (BMBA/PC) maintained low values of infection (1.5 ± 0.30 and 0 ± 0.30 respectively). Similarly, the mycelium of these pathogenic colonies and those confronted with *P. putida* (BMBI/Pc) failed to infect leaves C. wonder. When evaluating the protective effect of bacteria *in vivo* in C. wonder plants, only *B. subtilis* (CW+BMBA+Pc) generated a delay in *P. capsici* infection at day 14 (5.0 ± 0.44) (chapter 3). Regarding the determination of the expression of genes dependent on the salicylic acid pathway (*PR1*, *PR5*) and *EAS*, all genes were overexpressed at 8 hours in the presence of *P. capsici* (CW+Pc). However, only *PR1* and *EAS* maintained their overexpression at 24 h, these same genes were permanently expressed at low levels in plants that were inoculated only with *B. subtilis* (CW+BMBH+Pc), which indicates their participation

in the systemic response, induced by *B. subtilis*. Thus, it was determined that *B. subtilis* has the ability to suppress the growth and development of *P. capsici in vitro* and generates an *in vivo* delay of infection by this same pathogen.

Keywords: Antagonism, severity, overexpression, induced systemic response

Capítulo I. Revisión de literatura.

1.1 Cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.)

1.1.1 Generalidades

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) es uno de los más antiguos de América, pertenece a la familia Solanaceae, la cual está constituida por aproximadamente 30 especies. Sin embargo, gracias a sus propiedades físicas, químicas y bioquímicas, *C. annuum* es la especie de mayor relevancia en términos culturales y económicos (Antonio et al., 2018).

Las especies de chile están divididas en 11 clados: Andino, Caatinga, Flexuosum, Boliviano, Longidentatum, Mata Atlántica, Úrpura, Pubescens, Tovarii, Baccatum y Annuum (Figura 1). El clado Andino se caracteriza por presentar semillas de color marrón negruzco y hojas de color amarillo a ocre con frutos de color anaranjado rojo o borraivino. El clado Caatinga, incluye flores con coloraciones púrpura, violeta y manchas que pueden ser verdes, amarillas o blancas, además de frutos rojos o amarillos que se caracterizan por su alto grado de picor. En el caso de los clados Oliviano, Flexuosum y Mata Atlántica, presentan coloraciones amarillas ocre en sus corolas, así mismo, presentan frutos picantes. Adicionalmente, los clados Púrpura, Pubescens, Tovarii y Baccatum pueden diferenciarse por el color de la corola (blancas y púrpuras) (Carrizo-García, 2019). Finalmente, el clado Annuum está compuesto principalmente por *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum pubescens* R. y *Capsicum annuum* L, las cuales destacan por su importancia productiva y económica (Ibiza et al., 2012). Estas especies pueden diferenciarse entre sí, por su color, forma, tamaño de frutos y, por su vulnerabilidad hacia patógenos específicos (Colonna et al., 2019). En este sentido, *Capsicum chinense* Jacq. presenta alta vulnerabilidad al virus *Geminiviridae* (Yogindran et al., 2021); *Capsicum frutescens* frecuentemente desarrolla antracnosis ocasionada por patógenos del género *Colletotrichum* (Amorim et al., 2021). Por el contrario *Capsicum baccatum* presenta resistencia contra el ataque de hongos del género *Colletotrichum* (Kamvorn et al., 2014). En el caso de *Capsicum pubescens* desarrolla marchitamiento ocasionado por patógenos como *Botrytis* spp., *Fusarium* spp. y *Phytium* spp. (Almaraz-Sánchez et al., 2018). Finalmente, *Capsicum annuum* L. además de presentar vulnerabilidad a virus del género Gomovirus (Thakur et al., 2019) y, *Pythium* spp. (Arora et al., 2021), presenta alta susceptibilidad al ataque de

Phytophthora capsici (Kumar et al., 2021).

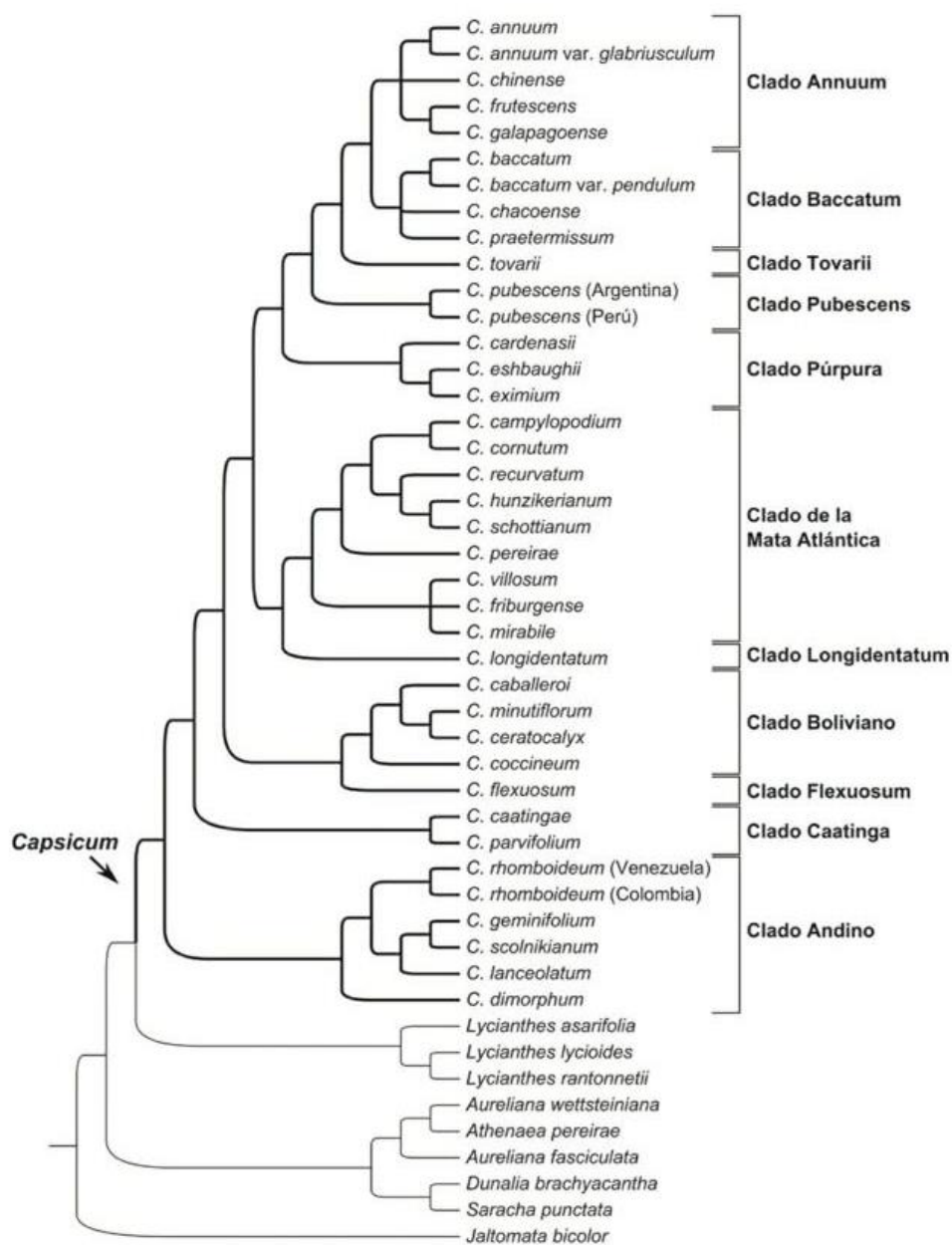


Figura 1. Análisis filogenético de *Capsicum* y agrupamiento de las especies de acuerdo a los grupos identificados (Carrizo-García, 2019).

C. annuum se caracteriza por presentar una raíz principal, la cual puede alcanzar una profundidad hasta de 70 cm, sus hojas tienen forma oval, elíptica o lanceolada, generalmente

presentan una coloración verdosa tenue o intensa. Las flores pueden estar en grupos de dos a cinco, aparecen en el ápice de las ramas, además, los frutos se pueden desarrollar en forma erguida o pedunculada (Gildarli, 2013). Aunque este cultivo crece en climas templados, tropicales y subtropicales, las condiciones óptimas de germinación son temperaturas entre 18 °C y 30 °C, así como altitudes de 2,000 y 3,000 msnm (Olatunji y Afolayan, 2018).

En cuanto a su composición nutrimental, son una buena fuente de micro y macronutrientes ya que contienen carotenoides, flavonoides, xantofilas y vitaminas (A, B, C y E) (Matsufuji *et al.*, 2007; Olatunji y Afolayan, 2018). Por esta razón llegan a ser utilizados como apoyo para tratar desórdenes urinarios, enfermedades cardiovasculares y dermatológicas (Matsufuji *et al.*, 2007). Además, poseen propiedades anticancerígenas, antioxidantes y antimicrobianas. Otras aplicaciones en las que se utilizan las plantas de chile son: elaboración de productos farmacéuticos, colorantes naturales, cosméticos, ingredientes activos y repelentes (Matsufuji *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014; Hernández-Pérez *et al.*, 2020).

1.1.2 Importancia económica y cultural de *C. annuum*

C. annuum es uno de los cultivos con mayor importancia en todo el mundo, ya que, a través de los años, su producción se ha incrementado de manera exponencial. Se estima una producción anual de 32.32 millones de toneladas (MT) en todo el mundo, de las cuales China se posiciona como el principal contribuyente con 16.12 MT (50 % de la producción), seguido por México (2.73 millones de toneladas MT), Turquía (2.18 MT), Indonesia (1.88 MT) y España (1.13 MT) principalmente (Po *et al.*, 2018).

En cuanto a la producción nacional, Sinaloa es el principal productor de chile en México seguido por Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí y Sonora. Así mismo, Michoacán es otro de los estados productores de dicho cultivo, con un valor estimado de producción de 147 mil toneladas de chile, dejando una derrama económica de 1,290 millones de pesos. Los principales municipios productores de chile de la entidad son Yurécuaro con 1,530 hectáreas (ha), Tanhuato (717 ha), Aguililla y Zamora (232 y 230 ha respectivamente), Vista hermosa (217 ha), Tacámbaro (169 ha) y finalmente Queréndaro con 115 ha (2018). Es por esto por lo que este cultivo juega un papel importante para la economía del estado y de cada uno de los municipios productores.

1.1.3 Principales enfermedades que afectan al cultivo de chile

Con frecuencia el cultivo de chile es afectado por enfermedades ocasionadas por hongos, virus, bacterias, nematodos y oomicetos fitopatógenos, los cuales pueden generar pérdidas productivas totales o parciales (Islam et al., 2020). Entre las enfermedades comunes del chile está la antracnosis, su sintomatología se manifiesta con lesiones color oscuro con forma curvada, en etapas tardías el fruto presenta lesiones necróticas hundidas con anillos concéntricos de acérvulos, las lesiones pueden presentarse en cualquier parte de la planta (follaje, tallos o frutos), las pérdidas del chile ocasionadas por esta enfermedad alcanzan hasta el 50% de la producción total (Than et al., 2008; Maimunah et al., 2019; Saha et al., 2016). Otros patógenos que generan bajos rendimientos productivos son los virus, en especial el virus del mosaico del tabaco, el cual al inicio de la infección genera clorosis en hojas, tallos y frutos, además de un severo retraso en el crecimiento, finalmente causa necrosis en el tejido de la planta (Pazarlar et al., 2013). Otro de los patógenos que afectan el cultivo de chile son de origen bacteriano, tal es el caso de *Xanthomonas campestris*, dicha bacteria ocasiona la enfermedad conocida como mancha bacteriana. Su sintomatología implica la defoliación y frutos con lesiones circulares necróticas, la bacteria puede ingresar por medio de estomas o por aberturas generadas por daño mecánico. (Bonas et al., 1989).

Finalmente, los oomicetos son otro grupo de patógenos que generan bajos rendimientos productivos en cultivos de chile, específicamente *C. annuum* en el cual ocasionan la enfermedad de tizón tardío; entre los principales patógenos se encuentra *Phytophthora infestans* y *P. capsici* (Naing et al., 2014; Leesutthiphonchai et al., 2018). Su sintomatología incluye: lesiones con aspecto “pardeado” en el tejido foliar, seguido de un blanqueamiento que termina en una lesión tenue bronceada; posteriormente, la enfermedad progresa hacia los tallos la cual se observa con una tonalidad verde oscuro y culmina con defoliación y muerte celular de los tallos (Barchenger et al., 2018).

1.2 *Phytophthora capsici*

1.2.1 Generalidades del oomiceto

Los oomicetos pertenecen a los organismos eucariotas, su pared celular está constituida principalmente por celulosa y polímeros de β -1,3 glucano, razón por la cual no son considerados

como hongos verdaderos. Generalmente presentan diferencias morfológicas en el tamaño de esporangios, pedicelos y oosporas, en cuanto a sus estructuras de resistencia (zoosporas) se caracterizan por tener dos flagelos ornamentados con pelos tripartitos (Thines, 2014). Las características macroscópicas del micelio incluyen coloración rosácea de forma algodonosa o petaloide (Nazerian et al., 2015).

Derivado de diversos análisis taxonómicos, las especies de *Phytophthora* se clasifican en 10 clados, en el caso de *P. capsici* pertenece al clado 2 (Martin et al., 2012). Dicho patógeno se encuentra distribuido en todo el mundo, no obstante, el primer registro en México fue en el año de 1956, hasta la fecha es considerado uno de los patógenos más devastadores en cultivos de chile a nivel mundial ya que puede infectar a su hospedante en cualquier zona (raíz, tallo, corona, flores, frutos y tejido foliar) y estadio de crecimiento (Siddique et al., 2019), esto genera pérdidas productivas en *C. annuum*, entre 10% y 60%, como consecuencia se ocasiona un desplazamiento y abandono de las zonas de cultivo así como disminución de las superficies cosechadas (Santos-Juarez, 2010).

1.2.3 Ciclo de vida de *P. capsici*

P. capsici infecta a varios miembros de las familias Solanaceae, Cucurbitaceae y Leguminosae, dicho patógeno posee dos modos de reproducción: el sexual, mediado por la producción de oosporas y el asexual que incluye la producción de zoosporas (Zhou et al., 2017). Cada una de estas estructuras le va a conferir distintos modos de infección (sexual-asesual). La infección por la vía sexual (heterotálica) está asociada con periodos largos de supervivencia fuera de un hospedante, además, requiere dos tipos de apareamiento de organismos diferentes con compatibilidad (A1 y A2). Este tipo de apareamiento está diferenciado por la producción de hormonas, esteroides y lípidos, además de la formación de gametangios masculinos (anteridios) y femeninos (ovogonias) y, mediante su fusión se genera una oospora diploide (Figura 2) (Judelson, 1997).

Las oosporas, producto del apareamiento (A1-A2) pueden madurar entre lapsos de dos semanas a tres meses, estas estructuras se caracterizan por tener paredes celulares gruesas; así mismo, pueden entrar en un estado de latencia y mantenerse viables por largos periodos de tiempo e infectar cuando las condiciones ambientales son adecuadas, una vez adheridas a la superficie vegetal producen tubos germinativos ramificados para formar micelio o esporangios y llevar a

cabo el proceso de proliferación. La principal ventaja de la vía sexual es que se genera mayor diversidad genética, lo cual se traduce en un aumento de la resiliencia de las nuevas generaciones del patógeno a factores bióticos y abióticos (Bi et al., 2014; Lamour y Hausbeck, 2000). Además, estos organismos desarrollan resistencia a los tratamientos convencionales lo que redundo en una persistencia más prologada en los cultivos agrícolas.

Por otro lado, la infección por la vía asexual puede comenzar con la germinación de los esporangios (Figura 2), para dar paso al desarrollo del tubo germinativo en la superficie del hospedante o bien, el esporangio libera zoosporas biflageladas las cuales a través del contacto con el agua, corrientes de viento o mediante quimiotaxis, se trasladan hasta la superficie del hospedante (Granke et al., 2009; Zohara et al., 2019). Una vez que las zoosporas llegan a las plantas, arrojan su flagelo y comienzan el proceso de enquistamiento; después de adherirse al tejido vegetal comienzan a penetrar mediante actividad enzimática, posteriormente, se desarrolla el tubo germinativo, éste empuja la membrana celular vegetal para formar una interfaz huésped-patógeno (etapa biotrófica); subsecuentemente se da la proliferación intracelular del patógeno, desencadenando necrosis y su esporulación para la generación de nuevas estructuras infectivas (etapa necrotrófica) (Figura 3) (Lamour et al., 2012).

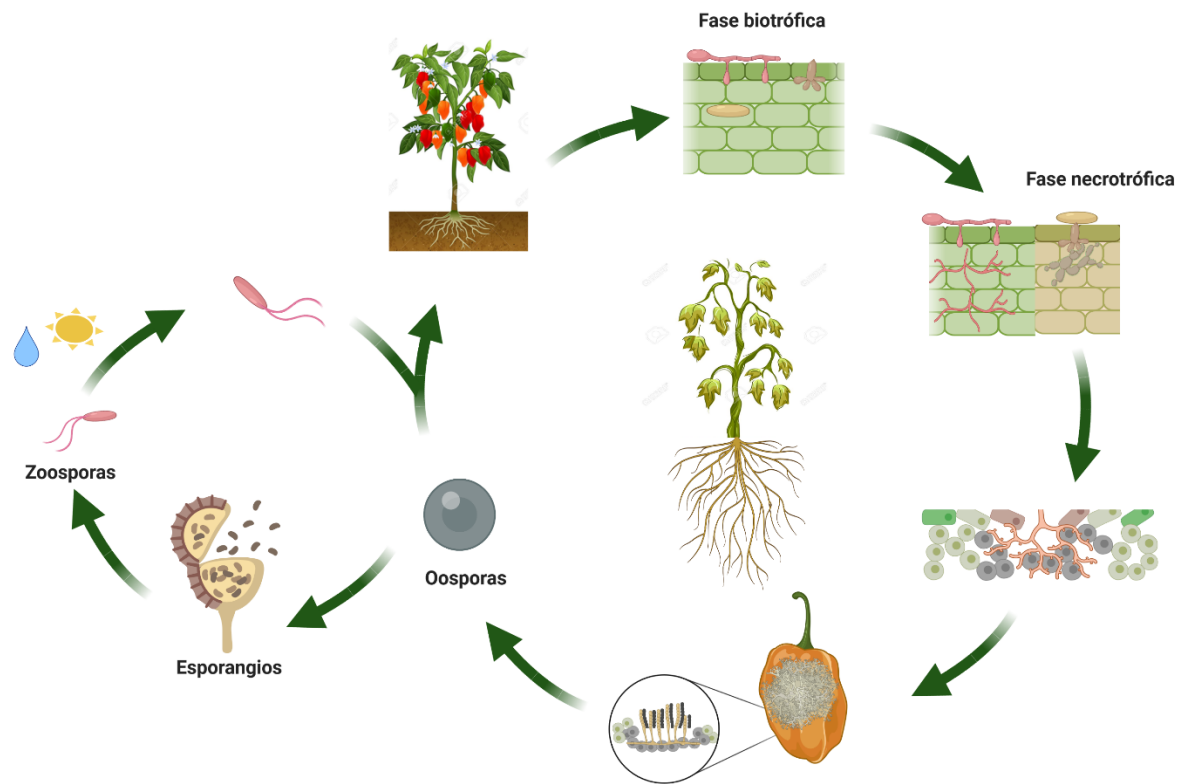


Figura 2. Ciclo de vida de *P. capsici* y sus diferentes estadios de infección (elaboración con Biorender).

La reproducción comienza con la maduración de las oosporas (vía sexual) las cuales pueden enquistarse directamente en el hospedante o dar paso a la formación de esporangios (vía asexual), los cuales una vez que maduran van a liberar zoosporas móviles que buscarán llegar a un hospedante con ayuda de factores abióticos, una vez que se enquistan comenzarán el proceso de penetración (fase biotrófica) y, posteriormente la proliferación que culminará con la maduración de las estructuras infectivas (fase necrotrófica) (Lamour et al., 2012).

1.3 Métodos de control de *P. capsici*

Con la finalidad de mitigar las afectaciones económicas y productivas ocasionadas por *P. capsici*, se han implementado diferentes estrategias para manejo que incluyen el control cultural, químico y biológico.

1.3.1 Control cultural

El control cultural incluye estrategias de manejo respetuosas con el ambiente, por ejemplo, el uso de camas elevadas, el desarrollo de sistemas de riego con el objetivo de mantener una correcta irrigación y drenado del agua, ya que altos valores de humedad favorecen el crecimiento y desarrollo del patógeno *P. capsici* (Sanogo y Ji, 2013). Otras prácticas consisten en realizar

enmiendas del suelo y mantillos protectores (Hausbeck y Lamour, 2004) o bien, el uso de variedades resistentes al patógeno o, la utilización de compostas que refuerzan la resistencia de las plantas (Gilardi et al., 2013). Así mismo, se usa la rotación de cultivos para favorecer el control de factores bióticos, ya que la falta de un hospedante evita que las posibles estructuras de resistencia que se mantienen viables en los suelos lleven a cabo el proceso de infección (Hausbeck y Lamour, 2004).

No obstante, estos manejos presentan algunas desventajas como la falta de acceso a los paquetes tecnológicos de variedades mejoradas y, los largos periodos de tiempo que se requieren para la aplicación de dichas estrategias, razón por la cual la mayoría de los agricultores optan por un control químico.

1.3.2 Control químico

El control químico implica el uso de fungicidas sintéticos, donde destacan el etridiazol, propamocarb, clorotalonil y oxiclورو de cobre (Barchenger y Lamour, 2018). Adicionalmente, se han diseñado mezclas de compuestos con mayor especificidad, por ejemplo: fenilamidas (metalaxil/mefenoxam), carbamatos (protiocarb y propamocarb), cianoacetamideoximas (cymoxanil), fosfonatos (fosetil-Al), acilpicóolidos (fluopicolida) y amidas de ácido carboxílico (mandi-propamida y dimetomorf) (Cacciola y di San Lio, 2008).

Sin embargo, la aplicación constante de dichos productos genera resistencia en el patógeno, lo cual obliga a la aplicación de mayores concentraciones de estos compuestos (Hunter et al., 2018); como consecuencia se ocasionan daños ecológicos y perjuicios a la salud de los productores y consumidores. En este sentido, es necesario buscar alternativas con un enfoque sustentable que permitan disminuir los efectos secundarios ocasionados por la aplicación de agroquímicos sin comprometer la seguridad alimentaria y el medio ambiente.

1.3.3 Estrategias de control biológico

El control biológico es definido como la reducción del inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno mediante uno o más organismos bajo un enfoque ecológico y sustentable (Alabouvette et al., 2006). Recientemente, para el control de patógenos como *P. capsici* se ha optado por utilizar microorganismos con la capacidad de ejercer una acción directa o indirecta sobre el patógeno (Khatun et al., 2018a). Dentro de los principales organismos

antagonistas destaca el género *Trichoderma* (Diénez et al., 2016), algunos hongos endófitos como *Muscodor albus* (Strobel et al., 2001), el cual ha mostrado propiedades antagonicas en cultivos de brócoli y chile (cv. *California wonder*®) (Camp et al., 2008).

Otros microorganismos utilizados para el control biológico son las levaduras (Liu et al., 2017). En este sentido, Chanchaichaovivat et al. (2007), reportaron que *Pichia guillermondii* reduce la infección en frutos de chile ocasionada por *P. capsici*, además de aumentar la preservación del fruto en post-cosecha con respecto a los tratamientos convencionales (agua clorada). Adicionalmente, los hongos micorrícicos arbusculares confieren un efecto protector a sus hospedantes contra factores bióticos y abióticos, tal es el caso de *Rhizophagus intraradices* y *Glomus mosseae*, los cuales disminuyen la infección en plantas de *C. annuum* infectadas con *P. capsici* (Tena et al., 2016). Por otro lado, las bacterias son otro grupo de microorganismos con propiedades benéficas importantes.

1.3.3.1 Bacterias como agentes de biocontrol de *P. capsici*

Las bacterias ofrecen beneficios como la disminución de daño por estrés ambiental, además, favorecen los procesos de recuperación de los suelos (Damodaran et al., 2013). Otros beneficios consisten en el mantenimiento de los procesos de fijación y solubilización de nutrientes, así como una red de comunicación con otros microorganismos para favorecer los procesos de crecimiento de las plantas. En cuanto a los mecanismos de biocontrol, confieren protección directa o indirecta contra el ataque de microorganismos patógenos del suelo, mediante la producción de moléculas elicitoras que modulan la activación de los mecanismos de defensa en las plantas (Báez-Vallejo et al., 2020). Además, producen moléculas antimicrobianas que afectan los procesos fisiológicos de los patógenos, lo que repercute en los procesos de biosíntesis del ADN y ARN, síntesis de proteínas y metabolismo celular (Hamed et al., 2011).

Se han identificado diferentes bacterias que muestran antagonismo contra patógenos (hongos y bacterias), tal es el caso de *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp. En el caso de *Streptomyces* spp. favorecen la solubilización de nutrientes y el aumento de la biodiversidad microbiana nativa del suelo (Sakineh et al., 2021; Báez-Vallejo et al., 2020). Además, producen metabolitos secundarios antimicrobianos que suprimen la infección en plantas de chile ocasionada por *P. capsici* (Trinidad-cruz et al., 2021). Así mismo, *B. subtilis*, se encuentra entre las especies candidatas para funcionar como agente de control biológico de diversos patógenos, ya que

produce compuestos orgánicos volátiles y difusibles con actividad inhibitoria sobre diferentes patógenos (Li et al., 2015). Se ha demostrado que *B. subtilis* estimula el crecimiento vegetal e induce la respuesta sistémica (RSI) en las plantas, lo cual es mediado por la producción de elicitores que pueden ser lipopéptidos, surfactinas y fengicidas (Ongena et al., 2007).

Otras bacterias cuya actividad contra *P. capsici* ha sido reportada son *Burkholderia* spp. y *Pseudomonas* spp., dichas bacterias pueden antagonizar a los patógenos mediante la producción de sideróforos, celulasas, proteasas, antibióticos y cianuros (Hyder et al., 2020). Además, también estimulan el crecimiento de las plantas mediante la producción de ácido indol-3-acético, fijación y solubilización de nutrientes (nitrógeno y fósforo) principalmente (Khatun et al., 2018a). Por otro lado, *Paenibacillus* spp. también se ha reportado con la capacidad de suprimir la actividad patogénica de *P. capsici*, su mecanismo de acción incluye la producción de polixinas, policétidos, ácido fusárico y algunas moléculas como auxinas, citoquininas y 2,3-butanodiol (Ryu et al., 2006), además de la producción de compuestos orgánicos volátiles (Sang et al., 2013) al igual que *Burkholderia cepacia* y *Candida* spp. (Yang et al., 2012). Sin embargo, el éxito de bicocontrol de estas bacterias, dependerá de los distintos mecanismos de acción que presenten para mitigar la actividad patogénica de otros organismos, su capacidad metabólica para producir moléculas antagónicas y, la capacidad de respuesta a diferentes estímulos (bióticos y abióticos). Es por esto, por lo que es necesario encontrar cepas que posean diferentes estrategias para interrumpir el ciclo de vida de los patógenos de plantas.

1.3.3.2 Mecanismo de antibiosis en bacterias

El mecanismo de antibiosis en cada bacteria comprende la producción de moléculas con potencial antimicrobiano; dentro de estas moléculas se encuentran compuestos orgánicos volátiles, estos compuestos pueden pertenecer a diferentes grupos químicos por ejemplo: aldehídos, cetonas, alquilos, alcoholes, alquenos, ésteres, alquinos, ácidos, éteres, compuestos heterocíclicos y fenólicos (Hyder et al., 2020). En cuanto a los compuestos volátiles producidos por bacterias se han identificado compuestos que presentan actividad antagónica contra *P. capsici*, tal es el caso del dimetil trisulfuro, 2-etil-3,6-dimetil, 2-metil pirazina y 2-etil-5-metil pirazina (Agisha et al., 2019). Otros compuestos cuya actividad antimicrobiana contra oomicetos ha sido reportada es el alcohol 3-metil-butanol y 2-etil-1-hexanol (Vlassi et al., 2020). De manera individual *Pseudomonas* sp. produce compuestos como el benzotiazol, ciclohexanol,

n-decanol, trisulfuro de dimetilo, 2-etil 1-hexanol y nonano, los cuales tienen actividad antimicrobiana, específicamente el 2,4-di-tert-butilfenol el cual afecta la germinación de zoosporas de *P. capsici* (Sang y Kim, 2012). De manera similar bacilomicina, fengycina, dimetilsulfóxido, 1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona inhiben el crecimiento de distintos fitopatógenos (Li et al., 2015).

Se han implementado otras estrategias con la finalidad de identificar compuestos volátiles novedosos, una de estas consiste en la utilización de diferentes fuentes de nutrientes y la suplementación de aminoácidos y proteínas (Lazazzara et al., 2017). Así como la interacción ente dos o más microorganismos (Ramírez-Vigil et al., 2020). No obstante, el éxito de estas técnicas estará en función de las características genéticas y metabólicas de cada organismo, por lo que es necesario la búsqueda de cepas con potencial metabólico para biosintetizar compuestos orgánicos volátiles (COVs) con mayor actividad inhibitoria.

Recientemente, se ha incursionado en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción planta-patógeno y planta-antagonista con la finalidad de encontrar nuevas estrategias para llevar a cabo el control de fitopatógenos.

1.4 Mecanismos de defensa bioquímica en Chile contra *P. capsici*

Las plantas poseen principalmente dos mecanismos de defensa, el primero es la resistencia sistémica adquirida asociada con patógenos biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos; la cual incluye la producción de especies reactivas de oxígeno y una acumulación de la hormona ácido salicílico (AS) principalmente (Díaz-Puentes, 2012). El segundo mecanismo es la resistencia sistémica inducida, el cual está asociado con la microbiota benéfica del suelo (rizobacterias, hongos y hongos micorrízicos principalmente), estos microorganismos pueden desencadenar una serie de señales a través de la producción de ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) que activan la respuesta inmune de las plantas (Figura 3) (Pieterse et al., 2014).

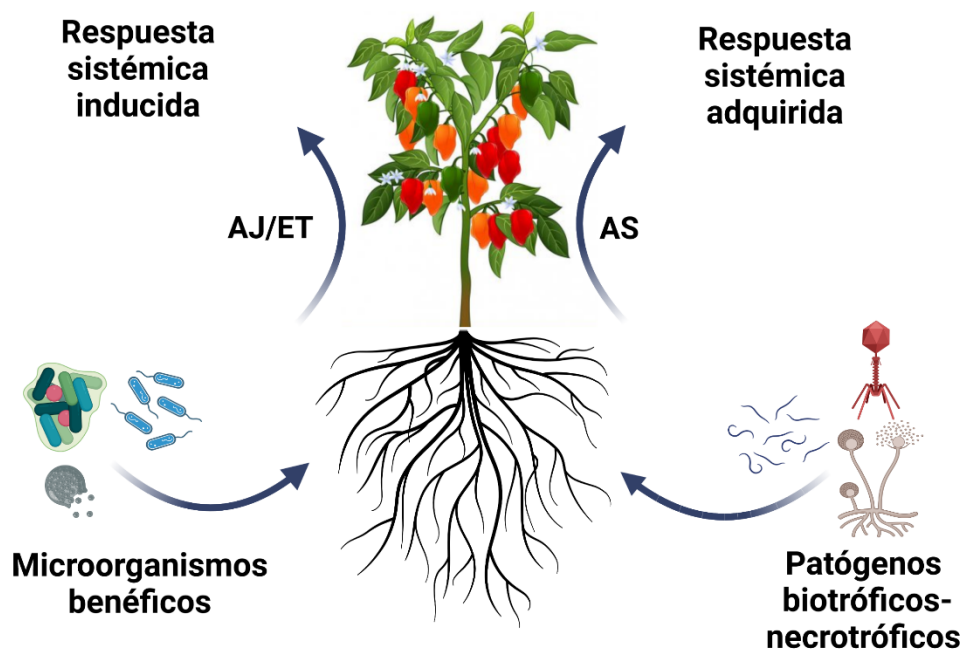


Figura 3. Respuesta sistémica inducida y adquirida (elaboración Biorender).

1.4.1 Resistencia sistémica adquirida

La resistencia sistémica adquirida (RSA) está asociada con patógenos biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos (Díaz-Puentes, 2012); incluye varios mecanismos de respuesta, uno de estos es la respuesta hipersensible, la cual ocurre de manera local y generalmente es desencadenada por fitopatógenos; esta respuesta puede ser duradera y va a generar un aumento del estallido oxidativo, como la generación de superóxido O_2^- y la posterior acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), generalmente estas reacciones favorecen el fortalecimiento de las paredes celulares a través de producción de lignina y compuestos fenólicos, así como la síntesis de fitohormonas y fitoalexinas como el capsidiol (Ahuja et al., 2012), la cual es una fitoalexina sesquiterpenoide que a altas concentraciones induce una respuesta de supresión de enfermedad alrededor de las zonas afectadas por patógenos; la biosíntesis de dicho compuesto es modulada principalmente por el gen *EAS* (5-epi-aristoloqueno sintasa) en plantas de *C. annuum* (Lin et al., 2014; Baba et al., 2020). A su vez, este gen es activado por el miembro de la familia CYP71D20 del citocromo P450 (Lee et al., 2017).

Adicionalmente, la RSA incluye el aumento del ácido salicílico (AS), dicha hormona participa como señalizador para desencadenar la expresión de genes relacionados con patogénesis (PR) (Hong & Hwang, 2005; Lee y Hwang, 2005). Además, modula la biosíntesis de otros metabolitos como el éster metílico, diterpenoide deshidroabietinal, un factor dependiente de glicerol-3-fosfato, ácido azelaico y ácido pipecólico, que a través de los tejidos sistémicos inducen el mecanismo de defensa en zonas que aún no han sido afectadas (Pieterse *et al.*, 2014).

El AS actúa como un co-activador, NPR1 (No expresor del gen 1 relacionado con la patogenicia), es secuestrado como un oligómero y se mantiene en el citoplasma, una vez que es monomerizado es translocado del citoplasma al núcleo, donde interactúa con el factor de transcripción TGA2 para promover la expresión de múltiples genes PR (Relacionados con patogénesis) (Wang *et al.*, 2018; Pieterse *et al.*, 2014). Se ha documentado la expresión del gen *PRI*, el cual es precursor para la formación de proteínas que se unen a esteroides para inhibir el crecimiento de patógenos; *PR2* que codifica la β -1,3-glucanasa; *PR5* secuencias similares a la taumatina (Rout *et al.*, 2016), *PR8* y *PR11* los cuales modulan la producción de quitinasas. Finalmente, se ha asociado a *PR10* (proteínas de defensa intracelular) con la vía de señalización de ácido salicílico (Wu *et al.*, 2018a). Aunado a esto, la RSA incluye comunicación a larga distancia dentro de la planta, mediada por un factor dependiente de glicerol-3-fosfato (G3P), ácido azelaico (AzA), el éster metílico de AS (MeSA), diterpenoide deshidroabietinal (DA) y ácido pipecólico (Pip) (Pieterse *et al.*, 2014).

La respuesta sistémica adquirida confiere una defensa duradera a la planta. En este sentido, uno de los mecanismos descritos entre una interacción incompatible (Solanaceae-patógeno) incluye una respuesta hipersensible, la cual comienza con una internalización de calcio, lo cual ocasiona una fuga de iones y cambios en el pH intracelular, esto favorece la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual sirve como señalizador para el reforzamiento de la pared celular y la producción de catalasas, peroxidasas, ascorbato y glutatión. La producción de H_2O_2 aunado a las modificaciones en el pH intracelular van a generar alteración en la síntesis de proteínas y por consecuencia la activación de procesos de apoptosis (muerte celular programada). A su vez el calcio, va a fungir como señalizador para la activación de factores de transcripción como los MAPK (fosforilación-desfosforilación). Estos procesos van a activar las vías metabólicas de

las fenilpropanoides, lo cual favorece la acumulación del AS, dicha hormona va a modular la activaciones de los genes involucrados en patogénesis (PR) (Desender et al., 2007).

Adicionalmente, se ha reportado que algunas cepas avirulentas de *P. capsici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici logran inducir SAR en plantas de Chile, y mediante esto disminuir la infección ocasionada por patógenos como *P. capsici*, *Verticillium dahliae* y *Botrytis* sp. a través de la activación de genes involucrados en patogénesis que codifican para *PR1*, β -1,3-glucanasa, quitinasa, peroxidasa y sesquiterpeno ciclasa (Hyong Woo y Byung Kook, 2011).

1.4.2 Resistencia sistémica inducida

La microbiota benéfica del suelo está compuesta principalmente por microorganismos que incluyen hongos, hongos micorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento; las cuales desempeñan papeles importantes en la protección de sus hospedantes. Uno de los principales mecanismos es mediante la inducción de la resistencia sistémica (RSI), la cual está modulada por el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (ET) (Pieterse et al., 2014). Se ha reportado que estas hormonas modulan la sobreexpresión de los genes *PR3* y *PR4* (que codifican para quitinasas). La expresión de *PR9* aumenta la actividad de peroxidasa (Kim et al., 2015). Otros elementos que participan en la RSI por rizobacterias son los factores transcripcionales MYB72, β -glucosidasa U42 (BGLU42) y MYC2 (Sharma et al., 2019).

Recientemente, se ha dado un enfoque importante al entendimiento de los procesos de respuesta de las plantas por la interacción entre microorganismos patógenos y no patógenos. En el caso de la respuesta mediada por microorganismos no patogénicos como las rizobacterias, se han dilucidado diferentes repuestas, tal como lo reportan Lee y Hwang (2005), quienes mediante una cepa avirulenta de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, lograron inducir la respuesta sistémica en hojas de *C. annuum*, lo cual reguló la sobreexpresión de genes de defensa que codifican para proteínas de patogénesis *PR1*, osmotina, peroxidasa, *PR10*, y tionina, además de una respuesta hipersensible mediada por la fuga de iones y la acumulación de H₂O₂.

Otras investigaciones apuntan a que la RSI generada por rizobacterias (*Bacillus. pumilus* SE34) está mediada por la formación de barreras estructurales como la producción de compuestos fenólicos y fitoalexinas o por la acumulación de quitinasas y β -1,3-glucanasas, lo cual termina en una protección eficiente contra patógenos del suelo (Kannoji et al., 2019). Se ha demostrado

que algunos compuestos de naturaleza volátil producidos por bacterias rizosféricas pueden funcionar como elicitores para activar genes involucrados en la respuesta sistémica de las plantas, tal como 2-etil-3,6-dimetilpirazina y 2-metilpirazina, los cuales inducen la expresión de genes PR (Patel et al., 2021). Otros COVs que fungen como moléculas elicitoras para la activación de los mecanismos de defensa en plantas son la fengicina, bacilomicina D, surfactina, macrolactina, difcicidina, bacilisina, 2,3-butanodiol y algunos exopolisacáridos (Wu et al., 2018a). Otros compuestos descritos incluyen al 2,3-butanodiol y su precursor 3-hidroxi-2-butanona, 2,3-butanodiol y 3-hidroxi-decanoil-homoserina lactona (Farag et al., 2013; Mhlongo et al., 2018). Sin embargo, aunque se ha demostrado que los COVs producidos por bacterias inducen la respuesta sistémica en las plantas aún no quedan completamente dilucidados los mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo dichos procesos.

Dado que algunos metabolitos secundarios poseen propiedades antagónicas contra fitopatógenos, autores como Shobha et al. (2019), correlacionan el potencial antifúngico *in vitro* de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* contra *P. capsici* y la capacidad para inducir RSI en plantas de Chile, lo cual se logra mediante la acumulación de fitoalexinas y compuestos fenólicos, además de la síntesis de proteínas PR y peroxidasas, así como la acumulación de ARN mensajeros que codifican para la fenilalanina amonio-liasa, calosa y proteína sintasa.

Adicionalmente, Sundaramoorthy et al. (2012), reportaron que las bacterias *B. subtilis* y *P. fluorescens* además de inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium solani* en un sistema dual, las bacterias de manera individual y en combinación, activaron RSI en plantas de *C. annuum* lo cual evitó que esta planta fuera infectada por *F. solani* a través del aumento en la producción de proteínas de patogénesis (PR) β -1,3-glucanasas, peroxidasas, quitinasas, síntesis de fitoalexinas, fenilalanina amoníaco liasa (PAL) y compuestos fenólicos.

Recientemente, algunas investigaciones están dirigidas a la búsqueda de microorganismos benéficos que produzcan moléculas elicitoras que no solo activen los genes involucrados en la resistencia sistémica inducida, sino que también puedan activar genes involucrados en la respuesta sistémica adquirida con la finalidad de que la planta desarrolle una respuesta de defensa más eficiente. En este sentido, Wu et al. (2018), reportaron que *Bacillus amyloliquefaciens* produce compuestos extracelulares como fengycina, bacilomicina D, surfactina, bacillaeno, macrolactina, difcicidina, bacilisina, 2,3-butanodiol y exopolisacáridos,

los cuales activan la transcripción de genes que codifican para la síntesis de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno (hormonas involucradas en la respuesta sistémica adquirida e inducida) en plantas de *Arabidopsis thaliana*, lo cual le confiere una mayor resistencia contra el ataque de *Pseudomonas syringae* y *Botrytis cinerea*.

No obstante, la activación de una u otra vía va a depender específicamente de las características metabólicas del organismo antagonista y la composición química de las moléculas elicitoras producidas, es por esto, por lo que es fundamental encontrar microorganismos que tengan la facultad de inducir ambos mecanismos de defensa en las plantas y mediante esto mejorar la inmunidad de las plantas para evitar infecciones por fitopatógenos.

1.5 Referencias

- Agisha, V. N., Kumar, A., Eapen, S. J., Sheoran, N., & Suseelabhai, R. (2019). Broad-spectrum antimicrobial activity of volatile organic compounds from endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against diverse plant pathogens. *Biocontrol Science and Technology*, 29(11), 1069–1089. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1657067>
- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>
- Alabouvette, C., Olivain, C., & Steinberg, C. (2006). Biological control of plant diseases: The European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 114(3), 329–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-0233-0>
- Almaraz-Sánchez, A., Ayala-Escobar, V., Tlatilpa-Santamaría, I. F., & Nieto-Angel, D. (2018). *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens*) en México. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1), 159–169. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1810-2>
- Amorim, A. F. S., Gilio, T. A. S., de Jesus, J. B., de Souza, L. H. A., dos Anjos, I. V., Araujo, K. L., Barelli, M. A. A., da Costa Preisigke, S., & Neves, L. G. (2021). Genetic improvement of *Capsicum frutescens*: hybrid vigor for anthracnosis resistance and production traits. *Euphytica*, 217(4), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10681-021-02810-2>
- Antonio, A. S., Wiedemann, L. S. M., & Junior, V. F. V. (2018). The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *Royal Society of Chemistry*, 8(45), 25767–25784. <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>
- Arora, H., Sharma, A., Sharma, S., Haron, F. F., Gafur, A., Sayyed, R. Z., & Datta, R. (2021). Pythium damping-off and root rot of *Capsicum annuum* L.: impacts, diagnosis, and management. *Microorganisms*, 9(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040823>
- Báez-Vallejo, N., Camarena-Pozos, D. A., Monribot-Villanueva, J. L., Ramírez-Vázquez, M., Carrión-Villarnovo, G. L., Guerrero-Analco, J. A., Partida-Martínez, L. P., & Reverchon, F. (2020). Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani*

- and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of *Fusarium dieback*. *Microbiological Research*, 235, 126440. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126440>
- Barchenger, D. W., & Lamour, K. H. (2018). Phenotypic and molecular characterization of neofusicoccum mangiferae, the causal agent of black locust decline. In *Frontiers in plant science* (Vol. 9, p. 628). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000250>
- Barchenger, Derek W, Lamour, K. H., & Bosland, P. W. (2018). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00628>
- Bi, Y., Hu, J., Cui, X., Shao, J., Lu, X., Meng, Q., & Liu, X. (2014b). Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. *Plant Pathology*, 63(6), 1365–1373. <https://doi.org/10.1111/ppa.12220>
- Bonas, U., Stall, R. E., & Staskawicz, B. (1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *MGG Molecular & General Genetics*, 218(1), 127–136. <https://doi.org/10.1007/BF00330575>
- Cacciola, S. O., & di San Lio, G. M. (2008). Management of citrus diseases caused by *Phytophthora* spp. in integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria (Vol. 3).
- Camp, A. R., Dillard, H. R., Smart, C. D., Pathology, P., & Biology, P. (2008). Efficacy of *Muscodor albus* for the control of *Phytophthora* blight of sweet pepper and butternut squash. *Plant Disease*, 92(11), 1488–1492.
- Carrizo-García, C. (2019). Breve historia evolutiva del género *Capsicum*. In *Los chiles le dan sabor al mundo* (pp. 26–40).
- Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., & Panijpan, B. (2007). Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*, 42(3), 326–335. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.016>
- FAO. (2002). El cultivo protegido en clima mediterráneo, Estudio FAO, producción y

- protección. In *Producción vegetal*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021265>
- Granke, L. L., Windstam, S. T., Hoch, H. C., Smart, C. D., & Hausbeck, M. K. (2009). Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. *Phytopathology*, *99*(11), 1258–1264. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-11-1258>
- Hamed, H. A., Moustafa, Y. A., & Abdel-Aziz, S. M. (2011). *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Science Journal*, *8*(4), 462–468.
- Hausbeck, M. K., & Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease*, *88*(12), 1292–1303. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1292>
- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M. del R., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2020). *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(6), 2972–2993. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12634>
- Hong, J.-K., & Hwang, B.-K. (2005). Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *The Plant Pathology Journal*, *21*(3), 195–206.
- Hunter, S., Williams, N., McDougal, R., Scott, P., & Garbelotto, M. (2018). Evidence for rapid adaptive evolution of tolerance to chemical treatments in *Phytophthora* species and its practical implications. *PLoS ONE*, *13*(12), e0208961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208961>
- Hyder, S., Gondal, A. S., Rizvi, Z. F., Ahmad, R., Alam, M. M., Hannan, A., Ahmed, W., Fatima, N., & Inam-ul-Haq, M. (2020). Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69410-3>
- Hyong Woo, C., & Byung Kook, H. (2011). Systemic acquired resistance of pepper to microbial

- pathogens. *Journal of Phytopathology*, 159(6), 393–400. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01781.x>
- Ibiza, V. P., Blanca, J., Cañizares, J., & Nuez, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(6), 1077–1088. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9744-z>
- Islam, A. H. M. S., Schreinemachers, P., & Kumar, S. (2020). Farmers' knowledge, perceptions and management of chili pepper anthracnose disease in Bangladesh. *Crop Protection*, 133, 105139. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105139>
- Judelson, H. S. (1997). The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetics and Biology*, 22(2), 65–76. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.1006>
- Kamvorn, W., Techawongstien, S., Techawongstien, S., & Theerakulpisut, P. (2014). Compatibility of inter-specific crosses between *Capsicum chinense* Jacq. and *Capsicum baccatum* L. at different fertilization stages. *Scientia Horticulturae*, 179, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.003>
- Kannoja, P., Choudhary, K. K., Srivastava, A. K., & Singh, A. K. (2019). PGPR Bioelicitors: induced systemic resistance (ISR) and proteomic perspective on biocontrol. In *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture* (pp. 67–84). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00004-5>
- Khatun, A., Farhana, T., Sabir, A. A., Islam, S. M. N., West, H. M., Rahman, M., & Islam, T. (2018a). *Pseudomonas* and *Burkholderia* inhibit growth and asexual development of *Phytophthora capsici*. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, 73(3–4), 123–135. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0065>
- Kim, S., Park, M., Yeom, S., Kim, Y., Lee, J. M., Lee, H., Seo, E., Choi, J., Cheong, K., Kim, K., Jung, K., Lee, G., Oh, S., Bae, C., Kim, S., Lee, H., Kim, S., Kim, M., Kang, B., ... Ahn, H. K. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Publishing Group*, 46(3), 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>

- Kumar, M., Kambham, M. R., Reddy, D. C. L., Sriram, S., & Singh, T. H. (2021). Identification of molecular marker linked to resistance gene loci against Indian isolate of *Phytophthora capsici* L. causing root rot in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Australasian Plant Pathology*, *51*, 211–220. <https://doi.org/10.1007/s13313-021-00837-6>
- Lamour, K. H., & Hausbeck, M. K. (2000). Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology*, *90*(4), 396–400. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.4.396>
- Lamour, Kurt H, Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 329–337. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00754.X>
- Lazazzara, V., Perazzolli, M., Pertot, I., Biasioli, F., Puopolo, G., & Cappellin, L. (2017). Growth media affect the volatilome and antimicrobial activity against *Phytophthora infestans* in four Lysobacter type strains. *Microbiological Research*, *201*, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.015>
- Lee, H., Kim, S., Kim, S., & Choi, D. (2017). Expansion of sesquiterpene biosynthetic gene clusters in pepper confers nonhost resistance to the Irish potato famine pathogen. *New Phytologist*, *215*(3), 1132–1143. <https://doi.org/10.1111/nph.14637>
- Lee, S. C., & Hwang, B. K. (2005). Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta*, *221*(6), 790–800. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1488-6>
- Leesutthiphonchai, W., Vu, A. L., Ah-fong, A. M. V., & Judelson, H. S. (2018). How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology*, *108*(8), 916–924. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0130-IA>
- Li, X. Y., Mao, Z. C., Wu, Y. X., Ho, H. H., & He, Y. Q. (2015). Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Biocontrol Science and Technology*, *25*(2), 132–143. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.960809>
- Lin, Y., Shih, S., Lin, W., Wu, J., Chen, Y., Hsieh, C., Guan, L., Lin, L., & Cheng, C. (2014).

- Plant science phytoalexin biosynthesis genes are regulated and involved in plant response to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Science*, 224, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.04.008>
- Liu, Y., Wang, W., Zhou, Y., Yao, S., Deng, L., & Zeng, K. (2017). Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biological Control*, 110, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.002>
- Maimunah, M., Azwana, A., & Pandala, C. (2019). The effectiveness of kenikir and betel leaves extract as bio fungicide to the causes of anthracnose disease (*Colletotrichum Capsici*) on chili plants (*Capsicum annuum* L.) with *in vitro*. *Budapest International Research in Exact Sciences (BirEx) Journal*, 2(1), 29–36. <https://doi.org/10.33258/birex.v2i1.221>
- Martin, F. N., Gloria Abad, Z., Balci, Y., & Ivors, K. (2012). Identification and detection of Phytophthora: Reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*, 96(8), 1080–1103. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1036-FE>
- Matsufuji, H., Ishikawa, K., Nunomura, O., Chino, M., & Takeda, M. (2007). Anti-oxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *Food Science and Technology*, 42(12), 1482–1488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01368.x>
- Mhlongo, M. I., Piater, L. A., Madala, N. E., Labuschagne, N., & Dubery, I. A. (2018). The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112>
- Naing, K. W., Anees, M., Nguyen, X. H., Lee, Y. S., Jeon, S. W., Kim, S. J., Kim, M. H., & Kim, K. Y. (2014). Biocontrol of late blight disease (*Phytophthora capsici*) of pepper and the plant growth promotion by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. *Journal of Phytopathology*, 162(6), 367–376. <https://doi.org/10.1111/jph.12198>
- Nazerian, E., Naji, H. R., Abdul-hamid, H., & Moradi, M. (2015). Phenotypic and molecular characterization of *Neofusicoccum mangiferae*, the causal agent of black locust decline. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.4172/2157->

7471.1000250

- Olatunji, T. L., & Afolayan, A. J. (2018). The suitability of chili pepper (*Capsicum annum L.*) for alleviating human micronutrient dietary deficiencies: a review. *Food Science and Nutrition*, 6(8), 2239–2251. <https://doi.org/10.1002/fsn3.790>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J., & Thonart, P. (2007). Brief report Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Patel, A., Kumar, A., Sheoran, N., Kumar, M., Sahu, K. P., Ganeshan, P., Ashajyothi, M., Gopalakrishnan, S., & Gogoi, R. (2021). Antifungal and defense elicitor activities of pyrazines identified in endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against fungal blast incited by *Magnaporthe oryzae* in rice. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(1), 261–272. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00373-3>
- Pazarlar, S., Gümüs, M., & Öztekin, G. B. (2013). The effects of tobacco mosaic virus infection on growth and physiological parameters in some pepper varieties (*Capsicum annum L.*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 427–433. <https://doi.org/10.15835/nbha4129008>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pieterse, M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Wees, S. C. M. Van, & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Po, L. G., Siddiq, M., & Shahzad, T. (2018). Chili, peppers, and Paprika - introduction - nomenclature and history - production and consumption. In *Handbook of vegetables and vegetable processing* (pp. 633–660).
- amírez Vigil, E., Peña Uribe, C. A., Iveth, L. R., & Homero, C. M. D. R. (2020). *In vitro* growth

of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, *10*(329), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>

Rout, E., Nanda, S., & Joshi, R. K. (2016). Molecular characterization and heterologous expression of a pathogen induced *PR5* gene from garlic (*Allium sativum* L.) conferring enhanced resistance to necrotrophic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, *144*(2), 345–360. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0772-y>

Ryu, C. M., Kim, J., Choi, O., Kim, S. H., & Park, C. S. (2006). Improvement of biological control capacity of *Paenibacillus polymyxa* E681 by seed pelleting on sesame. *Biological Control*, *39*(3), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.014>

SADER. (2018). Producción de Chile Verde Ocupa el Séptimo Lugar a Nivel Nacional (p. 1).

Saha, S., Jadhav, M. R., Shabeer, T. P. A., Banerjee, K., Sharma, B. K., Loganathan, M., & Rai, A. B. (2016). Safety assessment and bioefficacy of fluopyram 20 % + tebuconazole 20 % -40 SC in chilli, *Capsicum annum* L. against anthracnose disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *86*(2), 359–366. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0450-4>

Sakineh, A., Ayme, S., Akram, S., & Naser, S. (2021). Streptomyces strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88495-y>

Sang, M. K., & Kim, K. D. (2012). The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. *Journal of Applied Microbiology*, *113*(2), 383–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05330.x>

Sang, Mee Kyung, Shrestha, A., Kim, D. Y., Park, K., Pak, C. H., & Kim, K. D. (2013). Biocontrol of *Phytophthora* blight and anthracnose in pepper by sequentially selected antagonistic rhizobacteria against *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology Journal*, *29*(2), 154–167. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2012.0104>

- Sanogo, Soum, & Ji, P. (2013). Water management in relation to control of *Phytophthora capsici* in vegetable crops. *Agricultural Water Management*, 129, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.07.018>
- Santos Juarez, P. (2010). Estrategias para el control de *Phytophthora capsici* Leo. y *Fusarium solani* Mart. En el cultivo de chile(*Capsicum annuum* L.).
- Sharma, S., Chen, C., Navathe, S., Chand, R., & Pandey, S. P. (2019). A halotolerant growth promoting rhizobacteria triggers induced systemic resistance in plants and defends against fungal infection. *Scientific Reports*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40930-x>
- Shobha, M. ., Lakshmi, D. N., & Mahadeva Murthy, S. (2019). Induction of systemic resistance by rhizobacterial and endophytic fungi against foot rot disease of piper nigrum L. by increasing enzyme defense Activity. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 4(1), 86–98. <https://doi.org/10.22161/ijeab/4.1.15>
- Siddique, M. I., Lee, H. Y., Ro, N. Y., Han, K., Venkatesh, J., Solomon, A. M., Patil, A. S., Changkwian, A., Kwon, J. K., & Kang, B. C. (2019). Identifying candidate genes for *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum*) via genotyping-by-sequencing-based QTL mapping and genome-wide association study. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46342-1>
- Strobel, G. A., Dirkse, E., Sears, J., & Markworth, C. (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 147(11), 2943–2950.
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., & Samiyappan, R. (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annuum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 60(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.002>
- Tena, A. R., Esmeralda, E., Aguilar, Q., Rincón, G., & López, L. (2016). Mycorrhizae in *Capsicum annuum* L. to promote growth and biosecurity against *Phytophthora capsici* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 857–870.
- Thakur, H., Jindal, S. K., Sharma, A., & Dhaliwal, M. S. (2019). A monogenic dominant

- resistance for leaf curl virus disease in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Crop Protection*, *116*, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.10.007>
- Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W. J., & Hyde, K. D. (2008). Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang University: Science B*, *9*(10), 764–778. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0860007>
- Thines, M. (2014). Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes-a global overview. *European Journal of Plant Pathology*, *138*(3), 431–447. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0366-5>
- Trinidad-cruz, J. R., Rincón-enríquez, G., Evangelista-martínez, Z., & Quiñones-aguilar, E. E. (2021). Biorational control of *Phytophthora capsici* in pepper plants using *Streptomyces* spp. *Revista Chapingo*, *27*(6), 85–99. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2020.06.014>
- Vlassi, A., Nesler, A., Perazzolli, M., Lazazzara, V., Büschl, C., Parich, A., Puopolo, G., & Schuhmacher, R. (2020). Volatile organic compounds from *Lysobacter capsici* AZ78 as potential candidates for biological control of soilborne plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1748. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01748>
- Wang, X. dong, Bi, W. shuai, Gao, J., Yu, X. mei, Wang, H. yan, & Liu, D. qun. (2018). Systemic acquired resistance, NPR1, and pathogenesis-related genes in wheat and barley. *Journal of Integrative Agriculture*, *17*(11), 2468–2477. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61852-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61852-5)
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018a). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(5), 560–567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018b). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(5), 560–567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Yang, R., Fan, X., Cai, X., & Hu, F. (2015). The inhibitory mechanisms by mixtures of two

endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper Phytophthora blight. *Biological Control*, 85, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.013>

Yogindran, S., Kumar, M., Sahoo, L., Sanatombi, K., & Chakraborty, S. (2021). Occurrence of cotton leaf curl ultan virus and associated betasatellites with leaf curl disease of bhut-Jolokia chillies (*Capsicum chinense* Jacq.) in India. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2143–2152. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06223-1>

Zhou, T., Yang, X., Qiu, D., & Zeng, H. (2017). Inhibitory effects of xenocoumacin 1 on the different stages of *Phytophthora capsici* and its control effect on Phytophthora blight of pepper. *BioControl*, 62(2), 151–160. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9779-3>

Zohara, F., Mannan, A., Chandra, N., Rahman, M., & Islam, T. (2016). Biocatalysis and agricultural biotechnology inhibitory effects of *Pseudomonas* spp. on plant pathogen *Phytophthora capsici* *in vitro* and *in planta*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.009>

CAPÍTULO II. Antagonismo *in vitro* de aislados bacterianos contra *Phytophthora capsici*

2.1 Introducción

En México y a nivel mundial, se generan pérdidas productivas importantes en el cultivo de chile (*Capsicum* spp.) como consecuencia del ataque del oomiceto *P. capsici*, el cual es responsable de enfermedades como pudrición de la raíz, cuello, tallo, hojas, flores y frutos (Etxeberria et al., 2011). Debido a esto, se han implementado diferentes estrategias de control, tal es el caso de la rotación de cultivos, el control cultural (el cual incluye el uso de camas elevadas, el desarrollo de sistemas que permitan una correcta irrigación y drenado del agua) (Sanogo y Ji, 2012; Hausbeck y Lamour, 2004), y el control químico, el cual comprende la aplicación de fenilamidas, carbamatos, cianoacetamideoximas, fosfonatos, acilpicóolidos y amidas de ácido carboxílico (Cacciola y di San Lio, 2008; Barchenger et al., 2018).

No obstante, debido a los efectos negativos que estos productos tienen sobre el medio ambiente y la salud humana, no son del todo una alternativa viable para el manejo de patógenos. Por tanto, se busca aprovechar las propiedades benéficas que poseen algunos microorganismos del suelo principalmente hongos, protistas, nematodos, levaduras y bacterias (Mendes et al., 2013). En este sentido, las bacterias son consideradas las más importantes del ecosistema terrestre, ya que ofrecen diferentes beneficios, como la promoción del crecimiento vegetal, mediante la producción de moléculas como el ácido indol-3-acético, 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa, sideróforos, producción de fitohormonas o mediante la solubilización y fijación de nutrientes como el fosfato, nitrógeno y potasio a través de mecanismos de biofertilización y bioestimulación (Hyder et al., 2020; Olivares et al., 2017).

Otros beneficios de las bacterias implican la supresión de enfermedades causadas por fitopatógenos, mediante mecanismos como síntesis de enzimas extracelulares (quitinasas, β -1,3 glucanasas y proteasas), las cuales tienen como blanco degradar la pared celular de los fitopatógenos, otros compuestos biosintetizados por bacterias que poseen actividad antimicrobiana son la pirrolnitrina, pioluteorina, fenazina y cianuro de hidrógeno (Hoon et al., 2008; Paramanantham et al., 2020), también se incluye la producción de especies reactivas de oxígeno y la producción de compuestos volátiles con actividad biocida (Dukare y Paul, 2021).

Algunas investigaciones como la de Jae y Seralathan, (2008) han demostrado el potencial antagónico de cepas de *B. subtilis* contra *P. capsici* mediante la producción de cianuro de hidrógeno y sideróforos. De igual forma Zhang et al., (2010) reportaron que *B. subtilis* HS93 y *B. licheniformis* disminuyeron la incidencia de la infección ocasionada por *P. capsici* hasta un 80 %. Sin embargo, dado que *P. capsici* posee dos vías de reproducción (sexual y asexual), ambas vías le confieren diferentes mecanismos de infección, en el caso de la vía asexual va a generar estructuras infectivas como esporangios o zoosporas biflajeladas, las cuales se enquistan y dan paso al desarrollo del tubo germinativo en el hospedante (Mansfeld et al., 2020).

Por otro lado, la vía sexual, incluyen diferentes niveles de ploidía ya que poseen dos tipos de apareamiento (A1 y A2) (Barchenger et al., 2017). Este tipo de reproducción va a generar una mayor recombinación genética, lo cual se traduce en una mayor resistencia de sus estructuras infectivas (oosporas) contra los tratamientos químicos y/o biológicos (Kyung et al., 2008; Bi et al., 2014a), por lo que se hace necesario la búsqueda de nuevos microorganismos que puedan antagonizar la actividad patogénica de *P. capsici* mediante diferentes mecanismos. En este sentido, el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas*, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* sobre el crecimiento y desarrollo de *P. capsici*, así como el biocontrol *in vivo* en pruebas de severidad en chile cv. California Wonder.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Material microbiológico.

Se utilizaron cinco aislados bacterianos: *Bacillus* sp. (BMBH), *Pseudomonas putida* (BMBI), *Bacillus subtilis* (BMBA), *Bacillus amyloliquefaciens* (BMBC) y *Paenibacillus* spp (BMBP). Estos aislados forman parte del cepario del Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR IPN Unidad Michoacán, y fueron proporcionados por el Dr. C. Méndez-Inocencio. La cepa de *Phytophthora capsici* (6143) fue proporcionada por la Dra. S. P. Fernández-Pavia (Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo). Las bacterias fueron crecidas y mantenidas en agar nutritivo (AN, BD Bioxon®) y *P. capsici* en medio V8 (200 mL de jugo V8 Herdez®, 3g de CACO, 16g de Agar Bacteriológico (BD BIOXON®)). Las condiciones de crecimiento fueron en oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.2.2 Determinación del efecto antagonista de las bacterias contra *P. capsici*

Los experimentos de confrontación se realizaron en un sistema dual de acuerdo con Li et al. (2020), con algunas modificaciones. El diseño experimental fue completamente al azar, seis tratamientos cada uno con ocho repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron: *Bacillus* sp. + *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* + *P. capsici* (BMBI/Pc), *B. subtilis* + *P. capsici* (BMBA/Pc), *B. amyloliquefaciens* + *P. capsici* (BMBC/Pc), *Paenibacillus* spp + *P. capsici* (BMBP/Pc), y *P. capsici* (Pc) como tratamiento control. Inicialmente, un disco de 8 mm colonizado con micelio de *P. capsici* de cuatro días de crecimiento, se colocó en el centro de una caja Petri con medio de cultivo PDA (Agar Dextrosa y Papa). La caja Petri se marcó en cuatro cuadrantes y a 2.5 cm de distancia del disco de *P. capsici*, se estrió uniformemente el aislado bacteriano (de 48 h de edad) correspondiente. Las cajas se mantuvieron en condiciones de oscuridad a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. El experimento fue repetido cuatro veces.

Posterior a la confrontación del fitopatógeno con los aislados bacterianos, las variables evaluadas fueron inhibición del crecimiento micelial de *P. capsici*, alteraciones morfológicas del micelio, cuantificación, morfometría de esporangios, y capacidad patogénica *in vitro* e *in vivo* del oomiceto.

2.2.2.1 Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *P. capsici*

La inhibición del crecimiento micelial, se determinó a cuatro días posteriores a la confrontación (bacteria-oomiceto), según Ramírez Vigil et al. (2020), para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación $((R-r/R) * 100)$ donde R, es el diámetro micelial (cm) en el tratamiento control, y r el diámetro micelial en los tratamientos (bacteria + *P. capsici*).

2.2.2.2 Alteraciones morfológicas del micelio

Para evaluar el efecto de las bacterias sobre las hifas de *P. capsici*, se observó el micelio del oomiceto previamente confrontado con las bacterias. A cuatro días después de la confrontación se tomaron improntas de la colonia patógena y se colocó en un portaobjetos, luego se le adicionó una gota de colorante azul vegetal (González et al., 2011), y se visualizó en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Primo Star ZEISS, con una cámara integrada AxioCam Erc 5s.).

2.2.2.3 Cuantificación y morfometría de esporangios

Para evaluar el efecto de las bacterias sobre la producción de esporangios de *P. capsici*, después de cuatro días de confrontación (bacteria-oomiceto), de cada tratamiento se tomaron cinco discos de micelio (8 mm), se colocaron en cajas Petri con 20 mL de agua destilada estéril, y se incubaron a temperatura ambiente por 48 h bajo luz fluorescente. Posteriormente, mediante un estereoscopio (Carl Zeiss, Stemi 305) aumento 10X, se realizó el conteo de esporangios en cuatro campos visuales diferentes (superior, inferior, izquierdo y derecho).

Subsecuentemente, para evaluar si las bacterias ocasionaban alteraciones morfológicas en los esporangios de *P. capsici*, se tomaron cinco discos de micelio de la colonia patógena de cada tratamiento *Bacillus* sp. + *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* + *P. capsici* (BMBI/Pc), *B. subtilis* + *P. capsici* (BMBA/Pc), *B. amyloliquefaciens* + *P. capsici* (BMBC/Pc), *Paenibacillus* spp + *P. capsici* (BMBP/Pc), y solo *P. capsici* (Pc), se visualizaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Primo Star ZEISS, con una cámara integrada AxioCam Erc 5s.) con objetivo 40X. Se determinó el tamaño de los esporangios usando el software AxioVision Release 4.8.2.

2.2.2.4 Patogenicidad de *P. capsici* en plantas de Chile

Para verificar si *P. capsici* previamente confrontado con las bacterias mantenía su capacidad patogénica, se realizó un ensayo de hoja desprendida, las hojas fueron tomadas de plantas de

chile cv. C. Wonder (susceptible a *P. capsici*) de un mes de edad. Se usaron cámaras húmedas (cajas Petri con sanitas humedecidas con agua destilada). El diseño experimental fue completamente al azar. Los tratamientos evaluados fueron seis con siete repeticiones cada uno. En el centro de la hoja se inoculó un disco de micelio de 5 mm del oomiceto procedente de los tratamientos *Bacillus* sp. + *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* + *P. capsici* (BMBI/Pc), *B. subtilis* + *P. capsici* (BMBA/Pc), *B. amyloliquefaciens* + *P. capsici* (BMBC/Pc), *P. capsici* (Pc) como control positivo, y como control negativo (control -) se utilizaron discos de medio PDA. Las evaluaciones de severidad se realizaron durante ocho días, a los 2, 4, 6 y 8 días después de la inoculación (dpi). Las determinaciones se efectuaron de acuerdo con Li et al. (2020), con modificaciones, en escala de 0 a 5, donde 0 = Sin afectaciones, 1 = El área de la lesión representa del 1 al 10% de la superficie total de la hoja (STH), 2 = El área de la lesión representa el 11-20% (STH), 3 = El área de la lesión representa el 21-30% (STH), 4 = El área de la lesión representa el 31-50% (STH), 5 = El área de la lesión es más del 50% (STH).

Adicionalmente, se estableció un experimento en macetas con plantas de chile cv. C. Wonder. El diseño experimental fue completamente al azar. Los tratamientos evaluados fueron siete, cada uno con siete repeticiones. Plantas de un mes de edad se inocularon con micelio bacterizado de *P. capsici*, para ello el ápice de cada planta se removió y en la zona de la lesión se colocó el micelio del fitopatógeno, se cubrió con aluminio y sanito estéril humedecida (para crear un microclima idóneo para *P. capsici*). Las plantas se mantuvieron a 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 14 h. El riego se realizó diariamente con agua esterilizada, y una fertilización quincenal con una solución de Nitrofoska (3.15 g por litro). El porcentaje de supervivencia se determinó a los 2, 6, 8, 10, 12, 14 y 20 días después de la infección (dpi), siguiendo una escala del 0 al 5, donde 0 = sin afectaciones, 1 = Necrosis en superficie del tallo sin rodearlo, 2 = Necrosis circundante alrededor del tallo, 3 = Necrosis circundante alrededor del tallo y menos del 50 % de defoliación, 4 = Planta marchita 5 = Planta muerta. Se realizaron dos experimentos cada uno con cinco repeticiones.

2.2.3 Análisis estadístico

Los datos de inhibición del crecimiento micelial se normalizaron por el método de (arcoseno). Adicionalmente, los porcentajes de inhibición, la cuantificación y análisis morfométrico de esporangios, y pruebas de patogenicidad se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de

una vía, seguida de una prueba *pos hoc* de Tukey ($\alpha=0.05$). Se utilizó el software Minitab ® 19 y GraphPad Prism 8.0.1.

2.3 Resultados

2.3.1 Inhibición *in vitro* del crecimiento micelial de *P. capsici*

Al evaluar el potencial antagonista de los aislados bacterianos, en los tratamientos *Bacillus* sp. + *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* + *P. capsici* (BMBI/Pc), *B. subtilis* + *P. capsici* (BMBA/Pc), *B. amyloliquefaciens* + *P. capsici* (BMBC/Pc), *Paenibacillus* spp. + *P. capsici* (BMBP/Pc), y solo *P. capsici* (Pc), se obtuvo que después del periodo de confrontación se presentaron algunas alteraciones en la morfología del micelio de *P. capsici*. En el tratamiento BMBH/Pc y BMBI/Pc, se observaron colonias con bordes irregulares y cambios de pigmentación en el micelio (marrón) en los puntos de contacto con las bacterias (Figura 4A 2-3). De igual forma, las colonias de *P. capsici* en los tratamientos BMBP/Pc y BMBC/Pc presentaron disminución en la densidad del micelio con respecto al control (Pc). La cepa bacteriana en el tratamiento BMBA/Pc ocasionó alteraciones en el crecimiento vegetativo de *P. capsici* (Figura 4A 4).

Adicionalmente, al determinar las alteraciones generadas por las bacterias en el crecimiento de *P. capsici*, se generaron dos efectos, por un lado, en los tratamientos BMBH/Pc y BMBI/Pc, las bacterias *P. putida* y *Bacillus* sp. generaron una promoción del crecimiento micelial con valores promedio de $11.01 \% \pm 3.021$ y $15.72 \% \pm 5.34\%$, respectivamente. Por otro lado, la bacteria de *Paenibacillus* sp. en BMBP/Pc, generó un efecto discreto en la inhibición del crecimiento micelial del fitopatógeno con respecto al tratamiento control ($12.67 \% \pm 1.08$), mientras que *B. amyloliquefaciens* en BMBC/Pc y *B. subtilis* en BMBA/Pc generaron los valores máximos de inhibición $41.46 \% \pm 1.61$ y $53.96 \% \pm 1.62$, respectivamente (Figura 4B).

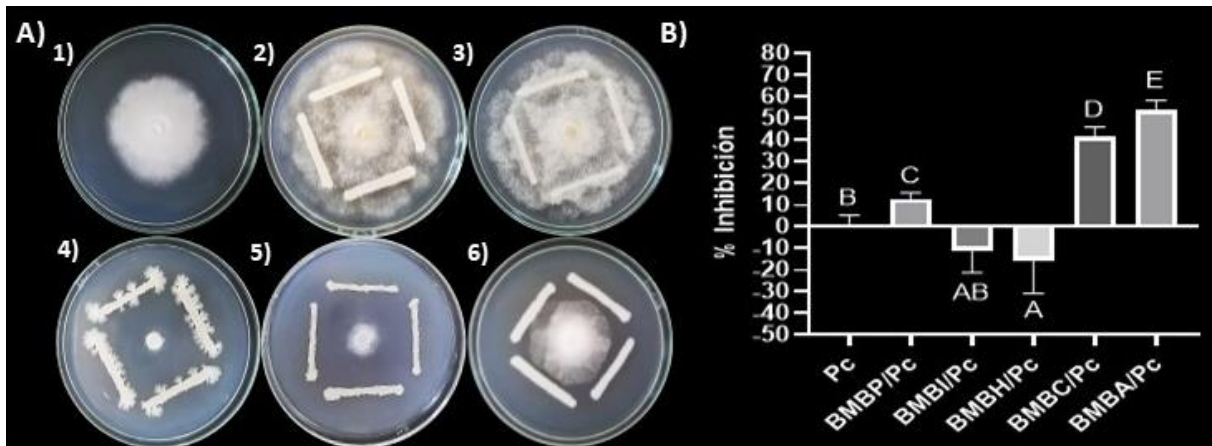


Figura 4. Efecto antagónico *in vitro* de las bacterias sobre *Phytophthora capsici*. A) *P. capsici* confrontado con las bacterias en un sistema dual: 1) *P. capsici* (Pc). 2) *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc). 3) *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc). 4) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc). 5) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc). 6) *Paenibacillus* sp. más *P. capsici* (BMBP/Pc). B) Inhibición del crecimiento micelial de *P. capsici*. En el gráfico cada barra representa la media \pm error estándar (n=8). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

2.3.2 Alteraciones morfológicas del micelio, y morfometría de esporangios de *P. capsici*

En las confrontaciones duales bacteria/oomiceto se identificaron algunas alteraciones a nivel celular (hifas). En los tratamientos BMBH/Pc, BMBI/Pc, BMBA/Pc, BMBC/Pc y BMBP/Pc, las alteraciones observadas en el micelio de *P. capsici* fueron disminución de la densidad de las hifas, enrollamientos, aumento de esporangios, vacuolización e hinchamientos (Figura 5). La cepa bacteriana de *B. subtilis* (BMBA/Pc) generó una disminución en la densidad de las hifas de *P. capsici* (objetivo 10X), adicionalmente con el objetivo 40X se hizo más evidente el enrollamiento de las hifas, esta alteración se presentó en la colonia fitopatógena de BMBC/Pc y BMBA/Pc (Figura 5). Al realizar la visualización con el objetivo 100X, el micelio de *P. capsici* en ambos sistemas (BMBA/Pc y BMBC/Pc) presentó alteraciones morfológicas similares que incluyeron vacuolización e hinchamiento. Afectaciones como la vacuolización de las hifas también se observó en el micelio del sistema BMBI/Pc. Adicionalmente, el micelio de *P. capsici* en los sistemas BMBH/Pc y BMBI/Pc presentó un aumento en la formación de estructuras infectivas (esporangios) en la colonia del oomiceto (Figura 5).

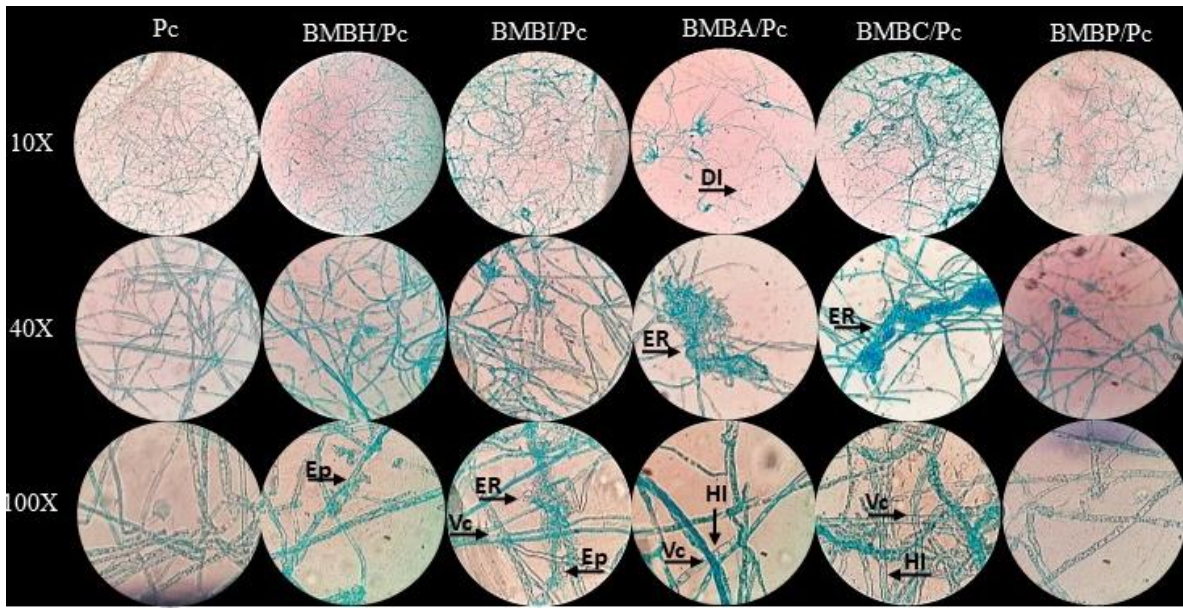


Figura 5. Alteraciones morfológicas de las hifas de *P. capsici* a cuatro días posteriores a la confrontación con las bacterias. *P. capsici* (Pc) *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc) *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc) *Paenibacillus* sp. más *P. capsici* (BMBP/Pc). Las claves en las micrografías representan; disminución de la densidad de las hifas (DI), enrollamientos (ER), aumento de esporangios (EP), vacuolización (VC) e hinchamientos (HI). Se utilizó colorante vegetal azul y se visualizó en un microscopio óptico con los objetivos 10X, 40X y 100X.

Al cuantificar la producción de estructuras infectivas, en los tratamientos BMBH/Pc, BMBI/Pc y BMBC/Pc se registró una menor densidad de hifas y esporangióforos de *P. capsici*, dicho efecto fue más evidente en el tratamiento BMBA/Pc (Figura 6A). Con relación a la producción de esporangios, la colonia fitopatógena en el tratamiento BMBI/PC produjo 236 ± 71.71 esporangios, sin embargo, no generó diferencia significativa en la producción de estas estructuras con respecto al control (Pc) (264 ± 51.63 esporangios). En el resto de los tratamientos, las bacterias generaron dos efectos, por un lado, *Bacillus* sp. en BMBH/Pc promovió la formación de esporangios (393 ± 72.26), mientras que *B. amyloliquefaciens* en BMBC/Pc y *B. subtilis* en BMBA/Pc disminuyeron la producción de dichas estructuras (37 ± 1.49 y 1 ± 0.73 esporangios, respectivamente) (Figura 6B).

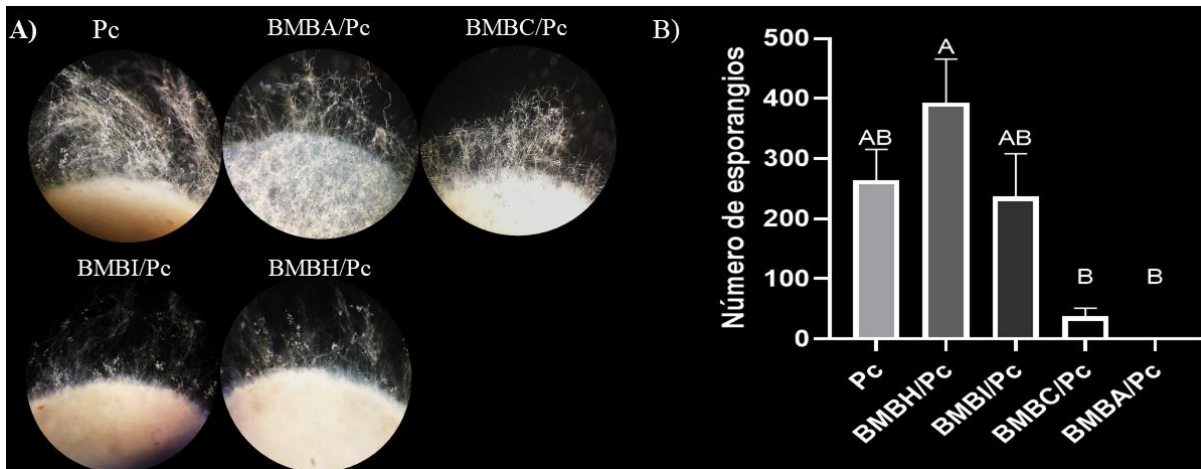


Figura 6. Efecto de las bacterias sobre la producción de esporangios en *P. capsici* a los 4 días postconfrontación. A) Hifas y esporangióforos de *P. capsici*. B) Producción de esporangios en los diferentes tratamientos. *P. capsici* (Pc) *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc) *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc) *Paenibacillus* sp. más *P. capsici* (BMBP/Pc). Cada barra representa la media \pm error estándar (n=5). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En lo que respecta a las alteraciones morfológicas de los esporangios de *P. capsici*, en el tratamiento Control (Pc) se desarrollaron esporangios semiesféricos típicos del patógeno, formas similares fueron evidentes en los tratamientos BMBH/Pc, BMBI/Pc y BMBC/Pc. Sin embargo, dichas estructuras fueron diferentes en el tratamiento BMBA/Pc, en donde se observaron esporangios con formas circulares (Figura 7A). En cuanto a la morfometría de dichas estructuras, el ancho de Pc fue de $30.29 \pm 1.10 \mu\text{m}$, mientras que los esporangios del tratamiento BMBI/PC no generó diferencia estadística con respecto al control ($32.64 \pm 1.25 \mu\text{m}$). Por otro lado, en el tratamiento de BMBIC/Pc, la colonia fitopatógena desarrolló estructuras con mayor ancho ($34.10 \pm 1.54 \mu\text{m}$). Efectos contrarios se presentaron en la colonia fitopatógena confrontada con *Bacillus* sp. en donde los esporangios tuvieron una disminución discreta del ancho ($28.80 \pm 1.370 \mu\text{m}$), la cual se hizo más evidente en el tratamiento BMBA/PC, donde el ancho de los esporangios disminuyó hasta 24.29 ± 1.09 (Figura 7C), dicha tendencia prevaleció en las mediciones del largo de los esporangios, ya que el valor mínimo fue registrado en la colonia fitopatógena del sistema BMBA/PC con $24.29 \mu\text{m} \pm 1.09$, mientras que en el resto de los tratamientos, las bacterias no ocasionaron alteraciones en el ancho de estas estructuras con respecto al tratamiento control (Pc) (Figura 7C).

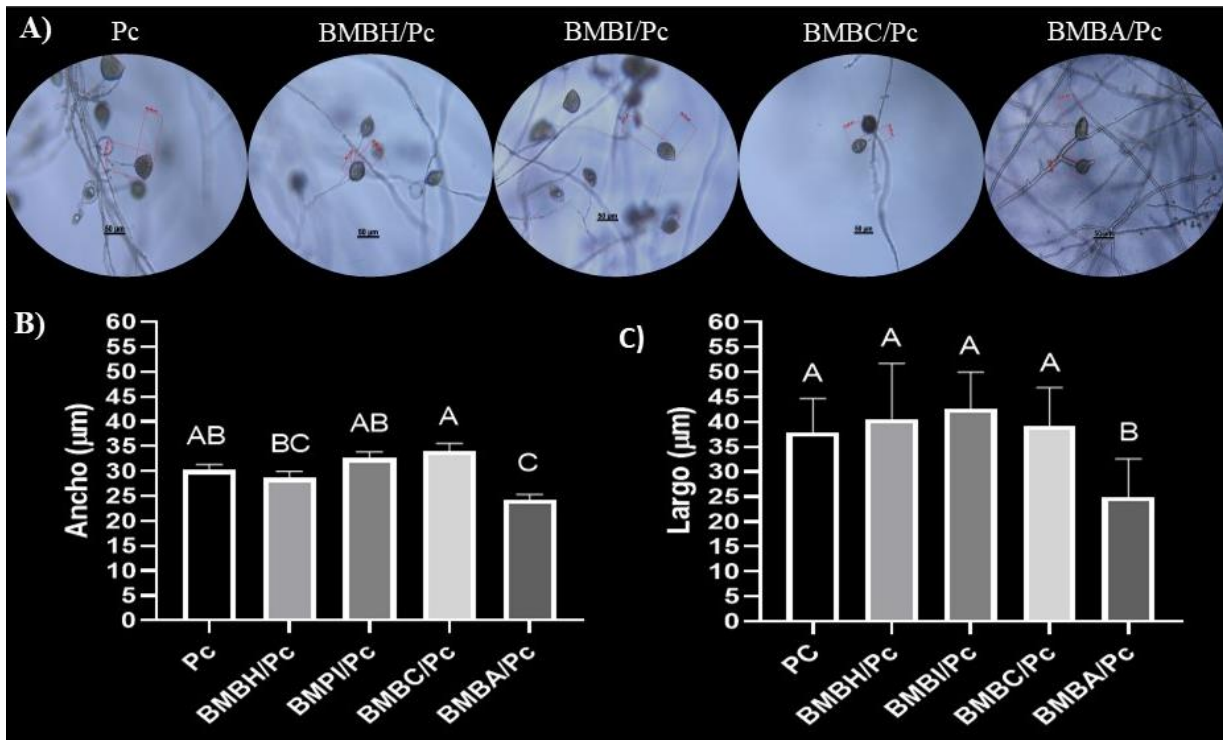


Figura 7. Efecto de las bacterias en la morfología de esporangios de *P. capsici*. A) Morfología de esporangios de *P. capsici*. B-C) Largo y ancho de esporangios. (Pc) *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc) *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc) *Paenibacillus* sp. más *P. capsici* (BMBP/Pc). B-C) Cada barra representa la media \pm error estándar de las variables largo y ancho de esporangios ($n=18 \pm EE$). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

2.3.3. Patogenicidad de cepas de *P. capsici* confrontadas con las bacterias en plantas de Chile

Para verificar la capacidad patogénica del oomiceto después de la confrontación con las bacterias, se establecieron dos ensayos, el primero fue *in vitro* (hoja desprendida) y el segundo *in vivo* (plántula de Chile). En ambos casos se usó el cv. California Wonder (susceptible a *P. capsici*). Para las evaluaciones en hoja desprendida, los primeros síntomas de infección se registraron al día cuatro en las hojas inoculadas con micelio del tratamiento BMBH/Pc, en donde se observó un cambio de pigmentación de la hoja. Así mismo, en el tratamiento con micelio de Pc y BMBH/Pc fue notoria la presencia de micelio blanco en la superficie de la hoja, el cual a partir del día seis se observó en más de la mitad de su superficie. En el caso del tratamiento BMBI/Pc se generó un retraso en la colonización micelial, ya que alcanzó valores similares al

tratamiento BMBH/Pc hasta el día ocho. Las hojas tratadas con micelio de BMBC/Pc y BMBA/Pc, a partir del día seis, únicamente mostraron cambio de pigmentación y, al día ocho no se observó la presencia de micelio en la superficie de la hoja (Figura 8).

Con relación a los índices de severidad, a partir del día cuatro, la hoja expuesta al micelio de Pc exhibió los índices de infección más altos (36.6 %), mientras que las hojas con el micelio de BMBH/Pc y BMBI/Pc, presentaron un retraso en la proliferación de éste con respecto al tratamiento control (Pc) (13.3% y 15 %, respectivamente). Las hojas inoculadas con micelio de BMBA/Pc y BMBC/Pc no presentaron síntomas (Tabla 1). Al día 6, los valores más altos de infección se generaron en las hojas tratadas con micelio de Pc y BMBH/Pc (50% y 45%, respectivamente), en contraste, valores inferiores (33 %) se observaron en el tratamiento BMBI/Pc. En las hojas inoculadas con micelio de BMBA/Pc y BMBC/Pc no se observó crecimiento micelial de *P. capsici*.

Finalmente, al día ocho las hojas del tratamiento control (Pc), fueron totalmente colonizadas, mientras que las hojas inoculadas con las colonias fitopatógenas de BMBH/Pc y BMBI/Pc mantuvieron valores promedio de colonización de 48.3 % y 41.6%, respectivamente, no obstante, entre estos valores no hubo diferencia significativa con respecto a Pc. En cuanto al tratamiento BMBC/Pc, la colonia fitopatógena disminuyó su capacidad de crecimiento en el tejido vegetal, ya que únicamente colonizó el 15 % de la superficie de las hojas, esta pérdida de patogenicidad se hizo más evidente en el tratamiento con micelio de BMBA/Pc, donde se mantuvieron promedios de colonización del 0 % (Tabla 1).

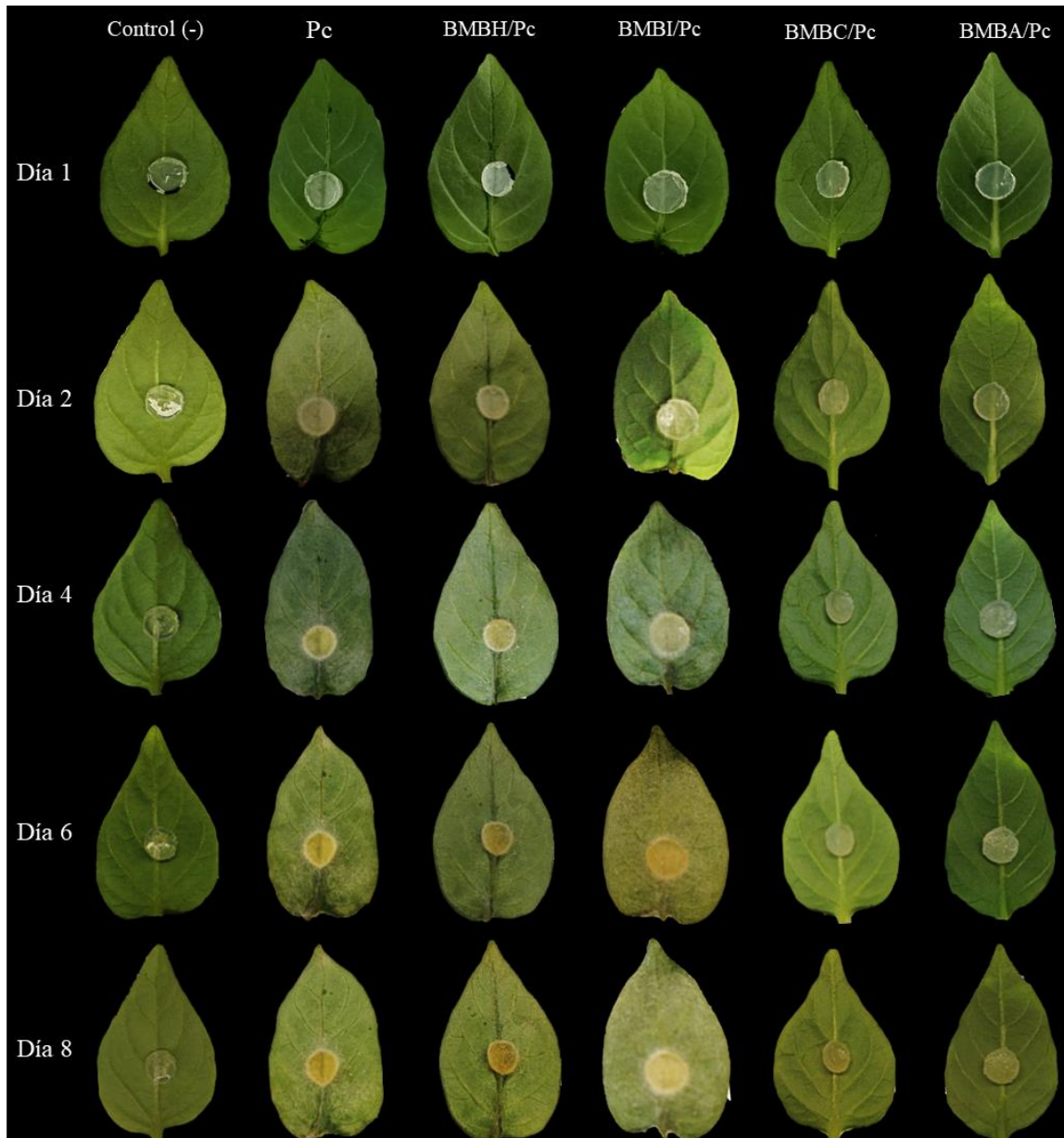


Figura 8. Severidad de *P. capsici* previamente confrontado con las bacterias. Las evaluaciones de severidad se realizaron a los 2, 4, 6 y 8 días posteriores a la inoculación (dpi). n=7. Control positivo (Pc), Control negativo (Control (-)), *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc).

Tabla 1. Severidad inducida por *P. capsici* en hojas de chile (cv. California Wonder)

Tratamientos	Severidad (0-5)			
	2	4	6	8 [†]
Control (-)	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
Pc	0.0 ± 0.0 ^a	3.66 ± 0.34 ^b	5.0 ± 0.34 ^a	5.0 ± 0.0 ^a
BMBH/Pc	0.0 ± 0.0 ^a	1.33 ± 0.47 ^a	4.5 ± 0.33 ^a	4.83 ± 0.16 ^a
BMBI/Pc	0.0 ± 0.0 ^a	1.5 ± 0.33 ^a	3.33 ± 0.80 ^a	4.16 ± 0.40 ^a
BMBA/Pc	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.50 ^b
BMBC/Pc	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	1.5 ± 0.76 ^b

[†]Días posteriores a la inoculación con *P. capsici*. Control positivo (Pc), Control negativo (Control (-), *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc). La escala de severidad fue de 0 a 5, donde 0 = Sin afectaciones, 1 = La lesión representa del 1 al 10% de la superficie total de la hoja (sth), 2 = La lesión representa el 11-20% (sth), 3 = La lesión representa el 21-30% (sth), 4 = La lesión representa el 31-50% (sth) y 5 = La lesión es más del 50% (sth). Los valores representan la media ± error estándar (n=6). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En lo que respecta al ensayo *in vivo* en los dos días posteriores a la inoculación (dpi) con el oomiceto, ninguna de las plantas inoculadas presentó indicios de infección (Figura 9). Al día cuatro las plantas del Control (Pc) comenzaron a presentar marchitez del tejido foliar, el cual al día seis fue más evidente, además, se observó la aparición de necrosis en el tallo de las plantas que fue progresando hasta el día doce. Al cuarto día, el micelio procedente de BMBP/Pc causó marchitez y necrosis en el sitio de inoculación, al día seis la necrosis se observó en el tallo, y al día doce proliferó en su totalidad. En el caso del micelio procedente de BMBH/Pc, aunque mantuvo su viabilidad patogénica, exhibió un retraso en la aparición de los síntomas, los cuales fueron visibles hasta el octavo día, estos síntomas consistieron en pérdida de turgencia y marchitez del tejido foliar (10 dpi), subsecuentemente al día doce se observó una necrosis generalizada de la planta.

El micelio procedente de BMBI/Pc no fue causante de sintomatología de enfermedad en las plantas de chile. Este mismo efecto se generó por el inoculo procedente de los tratamientos BMBA/Pc y BMBC/Pc. Adicionalmente, las plantas inoculadas con las colonias de estos mismos sistemas a partir del día ocho presentaron la emergencia de nuevos brotes en el área de

inoculación del fitopatógeno. Cabe señalar que los Controles negativos, (inoculados con medio de cultivo) también presentaron la emergencia de los brotes, los cuales al día veinte alcanzaron un tamaño similar al de las hojas verdaderas.

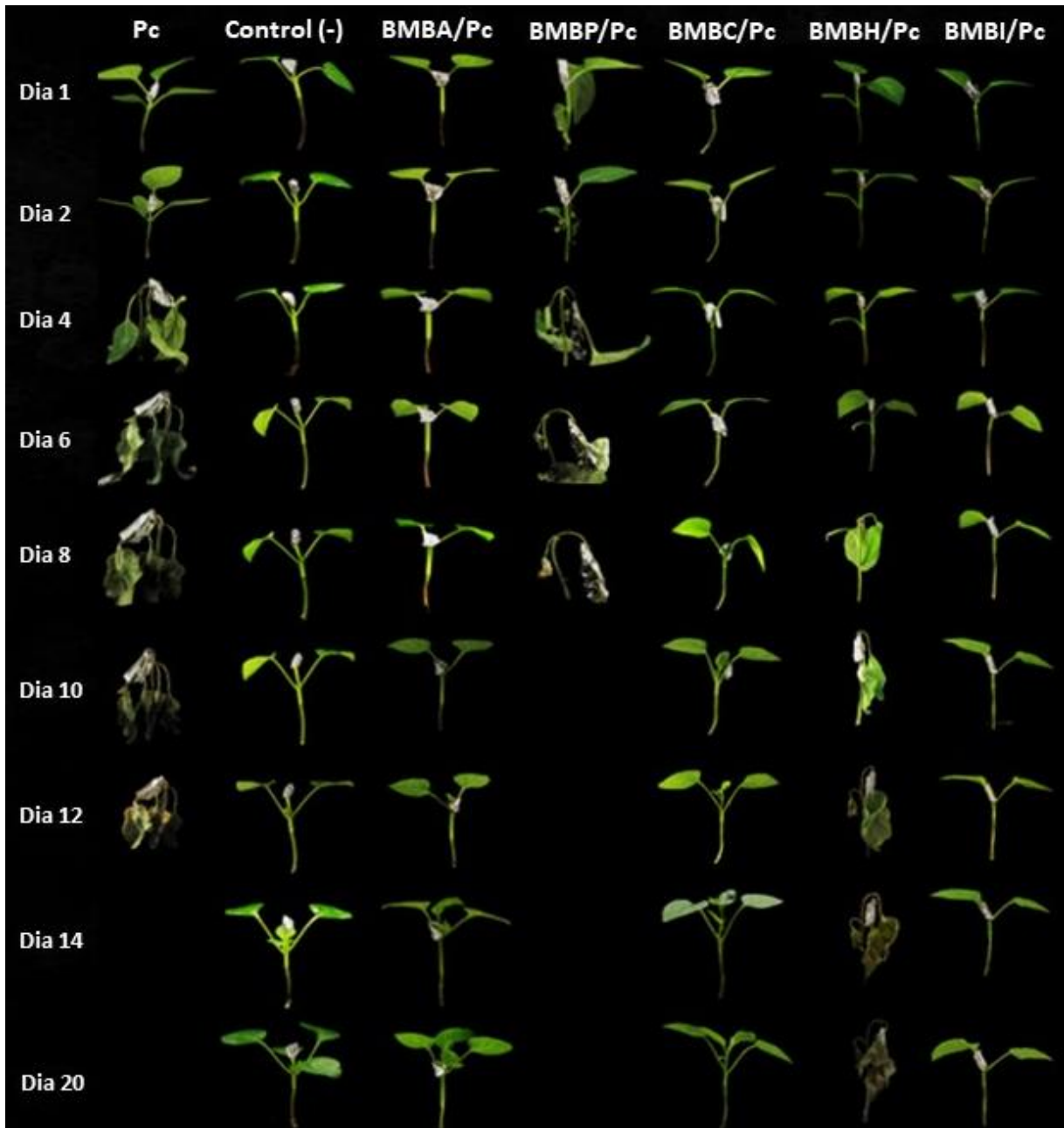


Figura 9. Efecto de *P. capsici* bacterizado en plantas de chile cv. C. Wonder. Control positivo (Pc), Control (-), *Basillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc). Las evaluaciones de la severidad de la enfermedad se realizaron a los días 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 20 días posteriores a la inoculación (dpi) con el oomiceto.

Al determinar de manera cuantitativa la capacidad infectiva del inóculo de *P. capsici* procedente de Pc, BMBH/Pc, BMBI/Pc, BMBC/Pc y BMBA/Pc, al día 1, no se observaron síntomas de infección en las plantas de los tratamientos. Al día 6, el micelio procedente del Control (Pc)

generó un 20 % de mortalidad en las plantas (Tabla 2), al día 12 dicho porcentaje de mortalidad se incrementó en un 80 %, a este mismo tiempo, el inoculo de BMBP/Pc ocasionó un 40 % de plantas muertas, mientras que el de BMBH/Pc únicamente afectó al 20 % de estas. Finalmente, al día veinte, el inoculo procedente del Control generó la muerte de todas las plantas, en el caso de las bacterias en BMBP/Pc y BMBH/Pc generaron 40 % de mortalidad (60% de sobrevivencia, tabla 2). El resto de las colonias patógenas tratadas con *B. subtilis*, *P. putida* y *B. amyloliquefaciens* mantuvieron un 100 % de sobrevivencia.

Tabla 2. Sobrevivencia de las plantas de Chile (cv. California Wonder) infectadas con micelio de *P. capsici* (previamente confrontado con las bacterias)

Tratamientos	Sobrevivencia (%)			
	1	6	12	20 [†]
Pc	100	80	20	0
Control (-)	100	100	100	100
BMBA/Pc	100	100	100	100
BMBP/Pc	100	100	60	60
BMBCPc	100	100	100	100
BMBHPc	100	100	80	60
BMBIPc	100	100	100	100

[†]Días posteriores a la inoculación. Control positivo (Pc), Control (-), *Bacillus* sp. más *P. capsici* (BMBH/Pc), *P. putida* más *P. capsici* (BMBI/Pc) *B. subtilis* más *P. capsici* (BMBA/Pc) *B. amyloliquefaciens* más *P. capsici* (BMBC/Pc), *Paenibacillus* sp. más *P. capsici* (BMBP/Pc). Cada valor representa la media de cinco repeticiones

2.4 Discusión

Phytophthora capsici es uno de los patógenos que más limitan la producción de chile (*Capsicum annuum*) a nivel mundial (Majid et al., 2016). Para el manejo del patógeno, una estrategia sustentable implica aprovechar los diferentes mecanismos de biocontrol que presentan algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Zhang et al., 2020). En el presente estudio, se evaluó el efecto biocontrolador de *Bacillus* sp (BMBH), *Pseudomonas putida* (BMBI), *Bacillus subtilis* (BMBA), *Bacillus amyloliquefaciens* (BMBC) y *Paenibacillus* spp. (BMBP) sobre *P. capsici* (Pc). Los ensayos *in vitro* revelaron alteraciones en la morfología micelial del oomiceto causadas por *Bacillus* sp y *P. putida* (bordes irregulares, baja densidad micelial en algunas zonas y cambios en la pigmentación). Estas alteraciones son similares a las ocasionadas por *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en el micelio de *Colletotrichum gloeosporioides* (Ramírez Vigil, et al., 2020) dicho efecto fue atribuido a las propiedades antifúngicas de metabolitos secundarios producidos por los antagonistas *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*). Otros autores como Henson et al. (1999) atribuyen los cambios de pigmentación (marrón) del micelio a un incremento en la síntesis de melanina en respuesta a situaciones de estrés biótico. En este sentido, la melanina es clave para llevar a cabo los procesos de penetración del tejido vegetal, esto puede indicar que *Bacillus* sp. en BMBH/Pc y *Pseudomonas putida* en BMBI/Pc están induciendo estrés sobre el crecimiento de *P. capsici*.

Otra de las alteraciones observadas en *P. capsici*, fue el desarrollo de micelio aplanado (crecimiento vegetativo) el cual fue inducido por *B. subtilis* en el tratamiento BMBA/Pc (Figura 4 A4). Las afectaciones en el crecimiento vegetativo se han atribuido a una alteración en la síntesis de proteínas de la pared celular, (proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Xie et al., 2021). Al respecto la enzima monofosfato adenosina ciclica juega un papel importante en la regulación de señales para la activación de procesos fisiológicos en *P. capsici*, recientemente se ha demostrado que una delección del gen *PcPdeH* que codifica para la fosfodiesterasa PcPdeH genera defectos en el crecimiento vegetativo y germinación en mutantes de *P. capsici*, además, aumenta su susceptibilidad al estrés oxidativo y disminuye su virulencia (Li et al., 2020). Con base en esto, *B. subtilis* podría estar produciendo metabolitos secundarios que afectan la expresión de genes involucrados en el crecimiento vegetativo de *P. capsici* y por consecuencia ocasionar esta alteración en el crecimiento.

Con relación al crecimiento micelial de *P. capsici*, se observaron dos tipos de alteraciones inducidas por las bacterias: promoción e inhibición del crecimiento. *Pseudomonas* (BMBI/Pc) y *Bacillus* sp. (BMBH/Pc) promovieron el crecimiento radial. Este efecto de promoción del crecimiento puede atribuirse a los compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por las bacterias ya que a la concentración en la que se están produciendo podría generar un efecto de hormesis, en este sentido, se ha reportado que algunos fungicidas como el Mefenoxam a concentraciones bajas (1×10^{-10} µg/ml) favorece el crecimiento micelial de *Pythium aphanidermatum* (10%) (Garzón et al., 2011). Así mismo, se ha reportado hormesis en *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia zea* como resultado a la exposición con etanol, ciazofamida y propamocarb (Flores y Garzon, 2013).

Por el contrario, la inhibición micelial de *P. capsici* registrada en BMBC/Pc y BMBA/Pc (*B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, respectivamente) puede ser resultado de una alteración en el perfil metabólico bacteriano, lo cual repercute en la producción de metabolitos secundarios con mayor actividad antimicrobiana. En este sentido, Sánchez-Fernández et al. (2016) reportan cambios en el perfil de COVs de un hongo endófito *Nodulisporium* sp. como resultado de interacciones intraespecíficas e interespecíficas con *Pythium aphanidermatum*, y concluyeron que el perfil cualitativo de COVs en un organismo va a depender de los competidores con los que se encuentra interactuando y a su vez esto definirá su actividad biológica.

En este trabajo, *B. subtilis* (tratamiento BMBC/Pc) tuvo la mayor actividad biológica contra *P. capsici*, esto se atribuye a sus capacidades metabólicas para producir compuestos con alto potencial antimicrobiano, así, por ejemplo, *B. subtilis* CL2 produjo compuestos como 2,3-butanodiona, el cual ejerció un potencial antimicrobiano contra patógenos fúngicos en postcosecha en *Lycium barbarum* L. (Ling et al., 2021). No obstante, se evidenció que la actividad antimicrobiana de una cepa no depende únicamente de un compuesto si no de la sinergia de dos o más compuestos, tal como lo reporta Mitchell et al. (2010), quienes demostraron que la mezcla de los compuestos volátiles producidos por *Muscodor crispans* resultan con una eficiente actividad antagónica contra los patógenos *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinérea*, *Aspergillus fumigatus* y *Pythium* sp. esto lo atribuyen a que los COVs actúan de manera sinérgica contra los patógenos, de tal manera que afectan diferentes procesos fisiológicos de estos. Adicionalmente Tajkarimi & Ibrahim, (2011) reportaron que compuestos

como el ácido láctico puede generar sinergia con otros compuestos para generar un efecto biocida sobre microorganismos como *E. coli*.

Con base en nuestros resultados, y las afectaciones diferenciales que se generaron en las colonias de *P. capsici*, se sugiere que las cepas bacterianas evaluadas contra *P. capsici* producen una mezcla de compuestos volátiles con diferentes blancos de acción sobre el fitopatógeno. En este sentido, se observaron diferentes alteraciones morfológicas del micelio de *P. capsici* en los tratamientos BMBA/Pc y BMBC/Pc, donde las bacterias *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* ocasionaron disminución en la densidad de hifas, vacuolización y enrollamiento. Alteraciones en el proceso de vacuolización han sido reportadas por Medina-Romero et al. (2017), quienes correlacionaron estos daños en las hifas con alteraciones en la permeabilidad de la membrana, fuga de iones e inhibición de la respiración celular, dicho efecto fue generado en *Fusarium oxysporum* como consecuencia de una exposición a una mezcla de seis COVs.

En cuanto al enrollamiento de las hifas, este fenómeno es un indicador de modificaciones en el crecimiento polarizado del patógeno, ya que para que este proceso se lleve a cabo de manera adecuada, debe de mantenerse la integridad de los microtúbulos para que consecuentemente pueda ocurrir el proceso de elongación. A su vez, el mecanismo de elongación es fundamental para el desarrollo asexual y patogenicidad de los microorganismos (Riquelme et al. 2018).

En este sentido, los tratamientos BMBC/Pc y BMBA/Pc (Figura 6B) generaron una disminución en la tasa de producción de esporangios, nuestros resultados son consistentes con los reportados por Li et al. (2020), ellos asociaron la disminución en el número de hifas, las alteraciones en la morfología y la disminución en la producción de esporangios con una baja movilidad de zoosporas y pérdida de su capacidad infectiva, en este punto, derivado de las alteraciones observadas en la producción de esporangios de *P. capsici* en nuestras determinaciones, también se evaluó el efecto que tenía la exposición a las bacterias en la morfología de dichas estructuras. En el tratamiento BMBA/Pc, al realizar las visualizaciones de *P. capsici* se observaron esporangios con alteraciones en su estructura (disminución en el tamaño). Al respecto, Liu et al. (2021) sugieren que los cambios en la morfología de esporangios son consecuencia de alteraciones en el crecimiento micelial de *P. capsici*, los esporangios se encogen y terminan en un colapso. Adicionalmente, Zohara et al. (2016) reportaron que los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas* spp. ocasionaron cambios en la morfología tanto de las hifas como

de las estructuras reproductivas (esporangios-zoosporas) de *P. capsici*, dichos daños los atribuyeron a una inhibición de enzimas como las quininas. Las quininas participan en diferentes vías de transducción de señales que modulan procesos celulares como la motilidad, proliferación, diferenciación y expresión génica.

Considerando lo expuesto por Li et al. (2020), también evaluamos la capacidad patogénica de *P. capsici* posterior a la confrontación con las bacterias. El ensayo fue con hojas desprendidas de chile cv. California Wonder. El inóculo procedente de los tratamientos BMBA/Pc y BMBC/Pc exhibieron los más bajos niveles de infección (Tabla 1). Al respecto, Safdar et al, (2017) quienes estudiaron los dominios de repeticiones ricas en leucina, específicamente el gen *PcLRR-RK1* que codifican para proteínas quininas, demostraron que las mutantes de *P. capsici* a las cuales se les silenció dicho gen, presentaron disminución del crecimiento de 30 a 50 %, además de alteraciones morfológicas en las hifas, y una disminución en el tamaño y producción de esporangios, finalmente estas mutantes también presentaron pérdida de la virulencia, ya que ocasionaron menor colonización en hojas de *N. benthamiana*. Estas aseveraciones sugieren que ciertos metabolitos producidos por las bacterias en BMBA/Pc y BMBC/Pc podrían estar afectando la expresión de genes como *PcLRR-RK1* ocasionando pérdida de virulencia en el oomiceto. Este fenómeno también pudo haber ocurrido en el experimento con plantas de cv. C. Wonder, donde el inóculo procedente de BMBI/Pc, BMBC/Pc y BMBA/Pc no causaron mortalidad.

2.5 Conclusión

Las bacterias evaluadas de *Bacillus* sp. (BMBH/Pc,) *P. putida* (BMBI/Pc), *B. subtilis* (BMBA/Pc), *B. amyloliquefaciens* (BMBC/Pc) indujeron alteraciones en el crecimiento y desarrollo de *P. capsici*, siendo la cepa de *B. subtilis* la que generó las mayores afectaciones en el crecimiento *in vitro* y la disminución en la producción de estructuras infectivas (esporangios) así como cambios en su morfología, lo cual generó pérdida de virulencia de *P. capsici*, por lo que la cepa de *B. subtilis* tiene potencial antagónico para ser utilizada en el bicontrol del oomiceto *P. capsici*.

2.6 Referencias

- Barchenger, Derek W, Lamour, K. H., & Bosland, P. W. (2018). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 9, 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00628>
- Barchenger, Derek W, Lamour, K. H., Sheu, Z., Shrestha, S., Kumar, S., Lin, S., Burlakoti, R., & Bosland, P. W. (2017). Intra and intergenomic variation of ploidy and clonality characterize *Phytophthora capsici* on *Capsicum* sp. in Taiwan. *Mycol Progress*, 16, 955–963. <https://doi.org/10.1007/s11557-017-1330-0>
- Bi, Y., Hu, J., Cui, X., Shao, J., Lu, X., Meng, Q., & Liu, X. (2014a). Sexual reproduction increases the possibility that *Phytophthora capsici* will develop resistance to dimethomorph in China. *Plant Pathology*, 63(6), 1365–1373. <https://doi.org/10.1111/ppa.12220>
- Cacciola, S. O., & di San Lio, G. M. (2008). *Management of citrus diseases caused by Phytophthora spp. in integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria* (Vol. 3).
- Dukare, A., & Paul, S. (2021). Rhizosphere Biological control of *Fusarium* wilt and growth promotion in pigeon pea (*Cajanus cajan*) by antagonistic rhizobacteria, displaying multiple modes of pathogen inhibition. *Rhizosphere*, 17, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100278>
- Etxeberria, A., Mendarte, S., & Larregla, S. (2011). Comparación de la tinción con bromuro de tetrazolio frente a un método de plasmólisis para la determinación de la viabilidad de las oosporas de *Phytophthora capsici*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.11.005>
- Flores, F. J., & Garzon, C. D. (2013). Detection and assessment of chemical hormesis on the radial growth *in vitro* of oomycetes and fungal plant pathogens. *Dose-Response*, 11(3), 361–373. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-026.Garzon>
- Garzón, C. D., Molineros, J. E., Yáñez, J. M., Flores, F. J., del Mar Jiménez-Gasco, M., & Moorman, G. W. (2011). Sublethal doses of mefenoxam enhance pythium damping-off of

- geranium. *Plant Disease*, 95(10), 1233–1237. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0693>
- González, M. S., Diamont, P. D., & Gutiérrez, B. (2011). Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no contaminante. *Bioagro*, 23(1), 65–68.
- Hausbeck, M. K., & Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88(12), 1292–1303. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1292>
- Henson, J. M., Butler, M. J., & Day, A. W. (1999). The dark side of the micelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 37(85), 447–471.
- Hoon, J., Sun, O. Æ., Kang, C., & Maheshwari, Æ. D. K. (2008). Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 581–585. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9505-5>
- Hyder, S., Gondal, A. S., Rizvi, Z. F., Ahmad, R., Alam, M. M., Hannan, A., Ahmed, W., Fatima, N., & Inam-ul-Haq, M. (2020). Characterization of native plant growth promoting rhizobacteria and their anti-oomycete potential against *Phytophthora capsici* affecting chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69410-3>
- Jae, K., & Seralathan, L. Æ. (2008). Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 1139–1145. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9585-2>
- Kyung, M., Chun, S., & Deok, K. (2008). Biological control of Phytophthora blight of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. *Biological Control*, 46(3), 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.017>
- Li, Y., Feng, X., Wang, X., Zheng, L., & Liu, H. (2020). Inhibitory effects of *Bacillus licheniformis* BL06 on *Phytophthora capsici* in pepper by multiple modes of action. *Biological Control*, 144, 104210. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104210>
- Li, X., Liu, Y., Tan, X., Li, D., Yang, X., Zhang, X., & Zhang, D. (2020). The high-affinity

phosphodiesterase *PcPdeH* is involved in the polarized growth and pathogenicity of *Phytophthora capsici*. *Fungal biology*, 124(3-4), 164-173.

Ling, L., Zhao, Y., Tu, Y., Yang, C., Ma, W., Feng, S., Lu, L., & Zhang, J. (2021). The inhibitory effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CL2 on pathogenic fungi of wolfberry. *Journal of Basic Microbiology*, 61(2), 110–121. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000522>

Liu, Y., Wang, W., Zhou, Y., Yao, S., Deng, L., & Zeng, K. (2017). Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. *Biological Control*, 110, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.002>

Majid, M. U., Awan, M. F., Fatima, K., Tahir, M. S., Ali, Q., Rashid, B., Rao, A. Q., Nasir, I. A., & Husnain, T. (2016). Genetinè ir biologinè phytophthora capsici kontrolè aitrriosios paprikos (*Capsicum annuum* L.) augalams: Apžvalga. *Zemdirbyste*, 103(4), 419–430. <https://doi.org/10.13080/z-a.2016.103.054>

Mansfeld, B. N., Colle, M., Zhang, C., Lin, Y., & Grumet, R. (2020). Developmentally regulated activation of defense allows for rapid inhibition of infection in age-related resistance to *Phytophthora capsici* in cucumber fruit. *BMC Genomics*, 20(1), 1–25.

Medina-Romero, Y. M., Roque-Flores, G., & Macías-Rubalcava, M. L. (2017). Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8209–8222. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8542-8>

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>

Mitchell, A. M., Strobel, G. A., Moore, E., Robison, R., & Sears, J. (2010). Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 156(1), 270–277. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032540-0>

Olivares, F. L., Busato, J. G., Paula, A. M. De, Lima, S., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2017).

- Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0112-x>
- Paramanatham, P., Swaraj, P. S., Siddhardha, B., Najat, M., M, E. A., & Asad, S. (2020). Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their biocontrol efficacy against phytopathogens of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, 156(1), 164–170. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1845842>
- Ramírez Vigil, E., Peña Uribe, C. A., Iveth, L. R., & Homero, C. M. D. R. (2020). *In vitro* growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. *3 Biotech*, 10(329), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G. H., Feldbrügge, M., Fleig, U., ... & Fischer, R. (2018). Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(2), e00068-17.
- Safdar, A., Li, Q., Shen, D., Chen, L., He, F., Wang, R., Zhang, M., Mafurah, J. J., Khan, S. A., & Dou, D. (2017). An LRR receptor kinase regulates growth, development and pathogenesis in *Phytophthora capsici*. *Microbiological Research*, 198, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.008>
- Sánchez-Fernández, R. E., Diaz, D., Duarte, G., Lappe-Oliveras, P., Sánchez, S., & Macías-Rubalcava, M. L. (2016). Antifungal volatile organic compounds from the endophyte *Nodulisporium* sp. Strain GS4d2IIIa: A qualitative change in the intraspecific and interspecific interactions with *Pythium aphanidermatum*. *Microbial Ecology*, 71(2), 347–364. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0679-3>
- Sanogo, Soum, & Ji, P. (2012). Integrated management of *Phytophthora capsici* on solanaceous and cucurbitaceous crops: current status, gaps in knowledge and research needs. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(4), 479–492. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.732117>

- Tajkarimi, M., & Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control*, 22(6), 801–804. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.030>
- Xie, M., Yang, J., Jianglu, K., Bai, N., Zhu, M., Yingmei, Z., Zhang, K. ., & Yang, J. (2021). *AoBck1* and *AoMkk1* are necessary to maintain cell wall integrity, vegetative growth, conidiation, stress resistance, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 649582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649582>
- Zhang, J., Guo, T., Tao, Z., Wang, P., & Tian, H. (2020). Plant physiology and biochemistry transcriptome profiling of genes involved in nutrient uptake regulated by phosphate-solubilizing bacteria in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 611–626. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.10.003>
- Zhang, S., White, T. L., Martinez, M. C., Mcinroy, J. A., Kloepper, J. W., & Klassen, W. (2010). Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of Phytophthora blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control*, 53(1), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.015>
- Zohara, F., Surovy, M. Z., Khatun, A., Prince, M. F. R. K., Akanda, M. A. M., Rahman, M., & Islam, M. T. (2019). Chitosan biostimulant controls infection of cucumber by *Phytophthora capsici* through suppression of asexual reproduction of the pathogen. *Acta Agrobotanica*, 72(1), 1–8. <https://doi.org/10.5586/aa.1763>

CAPÍTULO III. Respuesta de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) a la inoculación con *Bacillus subtilis* y *Phytophthora capsici*

3.1 Introducción

México es un país que cuenta con una amplia variedad de genotipos de chile, en este sentido *Capsicum annuum* L. es una de las variedades con mayor importancia a nivel productivo, económico y social (Moron-Rios & Alayon-Gamboa, 2014). Sin embargo, esta variedad de chile se caracteriza por presentar alta susceptibilidad al fitopatógeno *Phytophthora capsici* (Raman & Muthukathan, 2015), el cual es responsable de enfermedades como la marchitez y el tizón tardío (Zhang et al., 2020). Con la finalidad de atenuar su actividad patogénica, se han implementado diferentes estrategias de control, siendo los tratamientos químicos uno de los más utilizados (Che et al., 2019). Sin embargo, dado los efectos secundarios ocasionados por dichos compuestos (Hunter et al., 2018), se buscan alternativas con un enfoque sustentable, tal es el caso del aprovechamiento de las propiedades antagónicas de microorganismos benéficos (Khatun et al., 2018b).

Al respecto se ha documentado que la cepa de *Trichoderma asperellum* disminuyó la enfermedad ocasionada por *P. capsici* en plantas de *C. annuum* en un 71%, aunado a esto, la cepa fúngica resultó ser más eficaz en la supresión de la enfermedad con respecto al compuesto químico atridiazol (Segarra et al., 2013). Otros microorganismos con alto potencial biocontrolador de *P. capsici* en *C. annuum* son las bacterias. En este sentido, *Bacillus megaterium* (bacteria solubilizadora de fosfato) disminuyó la infección en campo por *P. capsici*, así mismo, se reportó un incremento en los rendimientos productivos en rangos de 36.2 y 47.7 %. Joo (2005), reportó el potencial antagónico de *Streptomyces halstedii* sobre *P. capsici* con valores del 1% de supervivencia del patógeno después de la confrontación con la bacteria. Por otro lado, Raman y Muthukathan (2015), registraron que las cepas de *Pseudomonas* presentaban potencial antagónico contra *P. capsici* en ensayos de confrontación *in vitro* en un sistema dual, además encontraron una correlación entre la inhibición *in vitro* del patógeno y la supresión de la infección en hojas y plantas de chile en condiciones de invernadero, aunado a esto, la inoculación bacteriana favorecía la elongación de brotes y raíces. No obstante, además de la promoción del crecimiento vegetal y la protección contra el ataque de fitopatógenos (Hartmann et al., 2021), las bacterias tienen la facultad de producir moléculas bioactivas que desencadenan

vías de señalización que favorecen la síntesis de moléculas relacionadas con la defensa (Sahu et al., 2019).

En este sentido, los mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a la interacción con microorganismos del suelo, se dividen principalmente en dos vías (Choudhary et al., 2007), la respuesta sistémica adquirida, que incluye una producción de ácido salicílico y, una respuesta hipersensible, un reforzamiento de la pared celular, síntesis de fitoalexinas y la síntesis de proteínas de patogénesis (Wongpita y Lomthaisong, 2010) y, la otra vía, conocida como respuesta sistémica inducida, mediada por la acumulación de ácido jasmónico y etileno (Bakker et al., 2007). Al respecto se ha documentado que la inoculación en raíces de chile de *Burkholderia cepacia* y *Trichoderma harzianum* indujeron la respuesta de defensa en la planta a través de la producción de proteínas PR con actividad de β -1,3-glucanasa, lo cual retrasó la infección por *P. capsici* (Ezziymani et al., 2017). Otra bacteria como *Paenibacillus polymyxa*, además de reducir el crecimiento radial *in vitro* de *P. capsici*, mediante la producción de amoníaco, celulosa, ácido indol-3-acético, proteasa, sideróforos y fosfato de calcio solubilizado, suprimió la severidad de la infección por este patógeno en plantas de *C. annuum*, en dicha planta, la inducción de los mecanismos de defensa incluyó un incremento en la actividad de fenilalanina amoníaco liasa, polifenol oxidasa y superóxido dismutasa, además de un incremento en la proteína de patogénesis PR4 (actividad de quitinasa) (Xu y Kim, 2016).

Adicionalmente, se han evaluado consorcios microbianos para contrarrestar la infección por oomicetos, en este sentido, dos bacterias del género *Bacillus amyloliquefaciens* inhibieron el crecimiento *in vitro* de *P. capsici* en un 67.2 %, este antagonismo lo atribuyeron principalmente a la producción de metabolitos secundarios como lipopéptidos. A su vez, estos compuestos producidos por las bacterias indujeron la resistencia sistémica en plantas de chile mediadas por la sobreproducción de proteínas de patogénesis PR4 (quitinasa) y GLU (β -1,3-glucanasa) (Yang et al., 2015). Así mismo, Lee y Hwang, (2005) reportaron que la cepa avirulenta de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, indujo la respuesta sistémica en hojas de *C. annuum*, mediante la sobreexpresión de genes de defensa que codifican para proteínas de patogénesis PR-1, osmotina, peroxidasa, PR10, tionina y SAR8.2, además de una respuesta hipersensible mediada por la fuga de iones y la acumulación de H₂O₂.

Adicionalmente, se ha reportado que *Bacillus amyloliquefaciens* a través de la producción de elicitors como fengycina, bacilomicina D, surfactina, bacillaeno, macrolactina, difficidina, bacilisina, 2,3-butanodiol y exopolisacáridos pueden activar la transcripción de genes de defensa en plantas de *Arabidopsis thaliana* mediada por la producción de ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno. A su vez, el aumento en la concentración de estas hormonas generó una expresión diferencial en los genes involucrados en cada una de estas vías. En el caso del ácido salicílico fue el gen *PR1* (proteína 1 relacionada con la patogenicidad), *PR2* (codifica para la β -1,3-glucanasa) y *PR5* (codifica las proteínas similares a la taumatina). El ácido jasmónico con *AOS* (codifica para óxido de aleno sintasa) y *Hel/PR4* (codifica para proteína similar a la heveína). En el caso del etileno modula la expresión del gen *chiB /PR3* (codifica para quitinasa) (Wu et al., 2018b).

De igual forma Chávez-Díaz. (2017), reportaron que mediante un consorcio bacteriano de *P. putida* y *P. tolaasii*, generaron la activación de la respuesta sistémica inducida en plantas de chile jalapeño, lo cual favoreció la disminución de la marchitez del chile en un 76% y la severidad en un 90% ocasionada por *P. capsici*, esta respuesta estuvo mediada principalmente por la expresión del gen *EAS* (Epi-5-aristoloqueno sintasa) y los genes *PR1* (proteína relacionada con patogénesis), *GLU* (*PR-2* β -1,3-glucanasa básica) y *CHI* (*PR-3* quitinasa básica tipo II).

Con base en estos antecedentes, en la presente investigación se evaluó el efecto de *Bacillus* sp. (BMBH), *Pseudomonas putida* (BMBI), *Bacillus subtilis* (BMBS), *Bacillus amyloliquefaciens* (BMBC) y *Paenibacillus* spp. (BMBP) sobre la severidad ocasionada por *P. capsici* en plantas de chile cv. California Wonder. Además, se determinaron los niveles de expresión de los genes de defensa *EAS* (epi-5-aristoloqueno sintasa), *PR1* (PR-1 proteína relacionada patogénesis) y *PR5* (proteína homóloga a taumatina) en las plantas de chile inoculadas con *B. subtilis* y *P. capsici*.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Severidad inducida por *P. capsici* en plantas de chile bacterizadas

3.2.1.1 Material microbiológico

Se utilizaron cinco aislados bacterianos: *Bacillus* sp. (BMBH), *Pseudomonas putida* (BMBI), *Bacillus subtilis* (BMBS), *Bacillus amyloliquefaciens* (BMBC) y *Paenibacillus* spp. (BMBP). Estos aislados fueron proporcionados por el Dr. C. Méndez-Inocencio y forman parte del cepario del Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR IPN Unidad Michoacán. La cepa de *Phytophthora capsici* (6143) fue proporcionada por la Dra. S. P. Fernández-Pavía (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Las bacterias fueron crecidas y mantenidas en agar nutritivo (AN, BD Bioxon®) y *P. capsici* en medio V8 (200 mL de jugo V8 Herdez®, 3g de CACO, 16g de agar Bacteriológico (BD BIOXON®)). Las condiciones de crecimiento fueron en oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.1.2 Material vegetal e inoculación

Se utilizaron plantas de chile cv. California Wonder (susceptible a *P. capsici*) (Katoch y Singh, 2021). Las semillas se desinfectaron superficialmente de acuerdo con Al-amodi (2016). Para su germinación se colocaron en una cámara húmeda a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta la emergencia de plántulas. Las bacterias se sembraron en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA), después de 24 horas de crecimiento, las colonias bacterianas fueron recolectadas y colocadas en un tubo falcón con agua estéril, posteriormente, se ajustó la concentración bacteriana (1×10^8) por espectrofotometría.

Las plántulas de chile con hojas verdaderas (1 mes de edad) fueron inoculadas con 1 mL de la suspensión bacteriana, luego se trasplantaron a macetas que contenían 25 cm^3 de arena estéril (una plántula por maceta). Las plántulas se mantuvieron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, con fotoperiodo de 14 h, el riego se realizó cada 24 h con agua estéril, y la fertilización quincenalmente con una solución de Nitrofoska (3.15 g por litro de agua).

La cepa de *P. capsici* se creció en medio de cultivo V8 durante cinco días en oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Posteriormente, las colonias fueron fraccionadas en cuatro segmentos equivalentes, cada segmento se sometió a un proceso de inducción de producción de esporangios, para lo cual cada

uno se transfirió a una caja Petri que contenía una solución isotónica de cloruro de sodio 0.9% (PISA®) por 10 minutos, después del periodo de exposición, los fragmentos se coloraron en una caja Petri con 20 mL de agua destilada estéril y, se mantuvieron durante 8 horas bajo luz fluorescente. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de liberación de zoosporas, donde los fragmentos previamente expuestos a luz fluorescente se sometieron a un choque térmico, primero a -20 °C durante 15 min, después se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 minutos.

La solución acuosa de cada fragmento fue recolectada en un matraz, y luego se realizó la cuantificación de las zoosporas utilizando un hematocitómetro (Marienfeld®). La concentración de zoosporas se ajustó a 10^5 zoosporas/mL. Una vez que las plantas tuvieron entre 4 y 6 hojas verdaderas fueron inoculadas en la base del tallo con 1 mL de la suspensión de zoosporas.

3.2.4. Diseño experimental y variables evaluadas.

El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento tuvo 6 plantas. Se evaluaron los tratamientos: Control negativo (plantas de chile sin inocular) (CW), plantas inoculadas solo con *P. capsici* (CW+Pc), plantas inoculadas con cada aislado bacteriano *Bacillus* sp. (CW+BMBH), *Pseudomonas putida* (CW+BMBI) *Bacillus subtilis* (CW+BMBA), *Bacillus amyloliquefaciens* (CW+BMBC) y *Paenibacillus* spp. (CW+BMBP), y la interacción tripartita que consistió en plantas inoculadas con los diferentes aislados bacterianos y el oomiceto; *Bacillus* sp. (CW+BMBH+Pc), *Pseudomonas putida* (CW+BMBI+Pc) *Bacillus subtilis* (CW+BMBA+Pc), *Bacillus amyloliquefaciens* (CW+BMBC+Pc) y *Paenibacillus* spp. (CW+BMBP+Pc). Las plantas que fueron inoculadas con *P. capsici*, se les monitoreo el índice de infección usando la escala de severidad de 1 a 6 (Tabla 3) (Sanogo, 2006).

Tabla 3. Escala de severidad en cv. C. wonder

Nivel de daño	Daño visible
0	Sin síntomas visibles
1	Necrosis en la base del tallo sin rodearlo
2	Necrosis circundante alrededor del tallo
3	Necrosis circundante alrededor del tallo y menos del 50 % de defoliación
4	Necrosis circundante alrededor del tallo y más del 50 % de defoliación
5	Planta marchita
6	Planta muerta

3.2.5 Expresión de genes de defensa en plantas de chile cv. C. wonder bacterizadas

3.2.5.1 Material vegetal e inoculación

Se utilizaron plantas de chile cv. California Wonder (susceptible a *P. capsici*) (Katoch y Singh, 2021). Las semillas se desinfectaron superficialmente de acuerdo con Al-amodi (2016). Para su germinación se colocaron en una cámara húmeda a 27 ± 2 °C hasta la emergencia de plántulas. *B. subtilis* se sembró en medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA), después de 24 horas de crecimiento, las colonias bacterianas fueron recolectadas y colocadas en un tubo falcón con agua estéril, posteriormente, se ajustó la concentración bacteriana (1×10^8) por espectrofotometría.

Las plantas de chile con hojas verdaderas (1 mes de edad) fueron inoculadas con 1 mL de la suspensión bacteriana, luego se trasplantaron a macetas que contenían 25 cm³ de arena estéril (una plántula por maceta). Las plántulas se mantuvieron a 27 ± 2 °C, con fotoperiodo de 14 h y, riego cada 24 h con agua estéril, se realizó una fertilización quincenal con una solución de Nitrofoska (3.15 g por litro de agua).

La cepa de *P. capsici* se creció en medio de cultivo V8 durante cinco días en oscuridad a 27 ± 2 °C. Posteriormente, las colonias fueron fraccionadas en cuatro segmentos equivalentes, cada segmento se sometió a un proceso de inducción de producción de esporangios, para lo cual cada uno se transfirió a una caja Petri que contenía una solución isotónica de cloruro de sodio 0.9% (PISA®) por 10 minutos, después del periodo de exposición, los fragmentos se coloraron en una

caja Petri con 20 mL de agua destilada estéril y, se mantuvieron durante 8 horas bajo luz fluorescente. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de liberación de zoosporas, donde los fragmentos previamente expuestos a luz fluorescente se sometieron a un choque térmico, primero a -20 °C durante 15 min, después se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 minutos.

La solución acuosa de cada fragmento fue recolectada en un matraz, y luego se realizó la cuantificación de las zoosporas utilizando un hematocitómetro (Marienfeld®). La concentración de zoosporas se ajustó a 10^5 zoosporas/mL. Una vez que las plantas tuvieron entre 4 y 6 hojas verdaderas fueron inoculadas en la base del tallo con 1 mL de la suspensión de zoosporas.

3.2.6. Diseño experimental y variables evaluadas.

El diseño experimental fue completamente al azar y cada tratamiento tuvo 8 plantas. Se evaluaron los tratamientos: Control (plantas de Chile sin inocular) (CW), plantas inoculadas solo con *P. capsici* (CW+Pc), plantas inoculadas con *B. subtilis* (CW+BMBA) y la interacción tripartita que consistió en plantas inoculadas con *B. subtilis* y el oomiceto (CW+BMBA+Pc).

3.2.5.1 Extracción de RNA

Se agruparon tres plantas para cada tratamiento, posteriormente fueron lavadas a flujo constante de agua, subsecuentemente, se separó la raíz y se realizó la extracción del RNA total utilizando el kit RNeasy® Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se verificó la pureza por espectrofotometría, y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El RNA total se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

3.2.5.2 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA, se utilizó el kit MMLV retrotranscriptasa (Promega), para lo cual se realizaron dos reacciones, la primera incluyó 10 µL de RNA (2 µg de RNA) al cual se le agregaron 0.8 µL de oligo DT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) y se agregaron 13.2 µL de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 65 °C por 10 minutos. La reacción dos, consistió en adicionar 12 µL de Buffer RT, 2 µL de dNTP mix (10 nM) y 2 µL de retrotranscriptasa (M-MLV). La mezcla se incubó durante una hora a 37 °C y después a 10 minutos a 70 °C. El cDNA resultante, se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

3.2.5.3 PCR en tiempo real

Las determinaciones de la expresión de los genes a evaluar (Tabla 4) se realizaron mediante PCR en tiempo real (CFX 96 de BIO-RAD), para lo cual se estableció una mezcla que contenía 13.075 μL de agua libre de nucleasas, 1.75 μL de Buffer 10X, 0.8 μL de MgCl_2 , 1 μL de cada primer (FW y RV, tabla 8), 0.25 μL de dNTPs mix, 2 μl SYBR Green (Invitrogen), 0.125 μl amplicasa (Biotecmol), y 5 μL de cDNA.

Para llevar a cabo la amplificación se utilizó un equipo CFX 96 de BIO-RAD. Inicialmente, la mezcla obtenida fue incubada a 95 °C durante cuatro minutos, después 40 ciclos a 95 °C por 15 s, esta etapa corresponde al proceso de desnaturalización. Posteriormente, se realizó un alineamiento a 65 °C durante 35 s y finalmente, una extensión a 72 °C por 35 s. Se utilizó como referencia interna el gen *GAPDH* (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa). La expresión relativa fue calculada por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de acuerdo con (Schmittgen y Livak, 2008).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en el análisis de expresión génica

Gen	Secuencias de oligonucleótidos (5' > 3')
<i>PR-1</i>	FW: CCC AAA ATT ACG CCA ATC AAA G RV: ACA TCT TCA CGG CAC CAG
<i>PR-5</i>	FW: TGG TGG AGT CTT GCA GTG C RW: CGT GCA ATG GAT CGC GTG
<i>EAS</i>	FW: GCT CAA GAA ATT GAA CCG AAG RV: TCT TCA TTA TAG ACA TCG CCC TCG
<i>GAPDH</i>	FW: GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC RV: GATCAACCACAGAGACATCCACAG

Nota: *PR-1* (Proteína relacionada con patogénesis 1), *PR-5* (Proteína homóloga a Taumatina), *EAS* (5-epiriaristológeno sintasa), *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa).

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las determinaciones de los ensayos de severidad y los análisis de expresión se sometieron a un análisis de varianza ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey $P \leq 0.05$. Los datos se graficaron en GraphPad Prism (8.0.1) y los análisis estadísticos se realizaron en el programa Minitab 19.

3.3 Resultados

3.3.1 Severidad de *P. capsici* en plantas de chile cv. C. wonder inoculadas con las bacterias

Las plantas que únicamente se inocularon con las bacterias *Bacillus* sp. (CW+BMBH), *Pseudomonas putida* (CW+BMBI) *Bacillus subtilis* (CW+BMBA), *Bacillus amyloliquefaciens* (CW+BMBC) y *Paenibacillus* spp. (CW+BMBP), no presentaron indicios de infección en ninguno de los días de evaluación, de acuerdo con la escala de severidad (tabla 5). Por otro lado, en el caso de las plantas inoculadas con zoosporas de *P. capsici* (CW+BMBH+Pc, CW+BMBI+Pc, CW+BMBA+Pc, CW+BMBC+Pc y CW+BMBP+Pc) a partir del cuarto día después de la inoculación, se comenzaron a generar indicios de infección en todos los tratamientos (índice más alto de severidad 1), correspondiente a una necrosis en la base del tallo sin rodearlo.

Al transcurrir el día 7 después de la infección, las plantas inoculadas con *Bacillus* sp. (CW+BMBH+Pc) presentaron mayor escala de daño (4.0) seguido por las plantas tratadas con *B. amyloliquefaciens* (CW+BMBC+Pc) y, subsecuentemente las plantas inoculadas con *P. putida* (CW+BMBI+Pc) (3.0 y 2.5 correspondientemente), el tratamiento Control (CW+Pc) mantuvo un valor de severidad de 1.5, por otro lado, el valor mínimo de severidad fue de 0.83 y se generó en el tratamiento con la bacteria *Paenibacillus* sp. (CW+BMBP).

Al transcurrir los 11 días después de la infección los valores de severidad se incrementaron, el valor máximo se generó en las plantas tratadas con *P. putida* (CW+BMBI+Pc), en el caso de las plantas inoculadas con *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp. generaron valores estadísticamente similares que oscilaron entre 4.16 y 5.66. Subsecuentemente, el índice de severidad en las plantas del tratamiento Control fue de 3.66, siendo así que, la única bacteria que retrasó la infección por *P. capsici* fue *B. subtilis* (CW+BMBA+Pc) con un valor de 2.5 (tabla 5).

Al día 14 las plantas del tratamiento Control (CW+Pc) presentaron el valor máximo de infección (6), correspondiente a una planta muerta, esta misma escala de severidad la presentaron las plantas inoculadas con *P. putida* y *B. amyloliquefaciens*. Adicionalmente, las bacterias de *Bacillus* sp. y *Paenibacillus* sp. ocasionaron una ligera disminución en los valores de severidad

de 5.83 y 5.66 respectivamente. No obstante, las plantas inoculadas con *B. subtilis* presentaron el mayor retraso en la infección con un valor de 5.0 en escala de severidad.

Tabla 5. Severidad inducida por *P. capsici* en plantas de chile bacterizadas.

Tratamiento	Severidad (0-6) †			
	4	7	11	14
CW	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^c
CW+BMBA	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^c
CW+BMBI	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^c
CW+BMBC	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^c
CW+BMBH	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^c
CW+BMBP	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^e	0.0 ± 0.0 ^c
CW+Pc	1.0 ± 0.68 ^{ab}	1.5 ± 0.76 ^{dc}	3.66 ± 0.55 ^{bc}	6.0 ± 0.0 ^a
Cw+BMBA+Pc	1.0 ± 0.33 ^{ab}	1.0 ± 0.68 ^{de}	2.5 ± 0.71 ^d	5.0 ± 0.44 ^b
CW+BMBI+Pc	0.33 ± 0.33 ^b	0.83 ± 0.40 ^{de}	4.16 ± 0.70 ^a	5.66 ± 0.21 ^a
CW+BMBC+Pc	1.0 ± 0.44 ^{ab}	3.0 ± 0.63 ^{ba}	5.66 ± 0.21 ^a	6.0 ± 0.0 ^a
CW+BMBH+Pc	0.33 ± 0.33 ^b	4.0 ± 0.63 ^a	5.33 ± 0.21 ^a	5.83 ± 0.16 ^a
CW+BMBP+Pc	2.0 ± 1.0 ^a	2.5 ± 0.5 ^{bc}	5.83 ± 0.16 ^c	6.0 ± 0.0 ^a

Los valores representan la media ± error estándar (n=6), letras diferentes en el gráfico indican variación estadística significativa. Se realizó un ANOVA de una vía, seguido de una prueba LSD ($p \leq 0.05$). Las determinaciones fueron a los 4, 7, 11, y 14 (dpi): CW: California Wonder. BMBA: *B. subtilis*. BMBP: *Paenibacillus* sp. BMBC: *B. amyloliquefaciens*. BMBH: *Bacillus* sp. BMPI: *Pseudomonas putida*. Pc: *P. capsici*. La escala de severidad fue: † 0: Sin síntomas visibles; 1: Necrosis en la base del tallo sin rodearlo; 2: Necrosis circundante alrededor del tallo; 3: Necrosis circundante alrededor del tallo y menos de 50% de defoliación; 4: Necrosis circundante en la base del tallo y más de 50% de defoliación; 5: Planta marchita; 6: Planta muerta (Sanogo, 2006).

3.3.2 Expresión de genes de defensa en plantas de chile cv. C. wonder inoculadas con *B. subtilis* y *P. capsici*

Inicialmente, la expresión del gen *PR1* en plantas de chile fue diferencial entre los tratamientos evaluados y los tiempos de evaluación. En este sentido, a las 8 horas los niveles menores de expresión de dicho gen se generaron en las plantas inoculadas con *B. subtilis* (CW+BMBA) y, en las plantas que posteriormente se les adicionó las zoosporas de *P. capsici* (CW+BMBA+Pc) con valores de 1.50 y 1.54 veces respectivamente, por otro lado, las plantas que únicamente se trataron con zoosporas de *P. capsici* (CW+Pc) presentaron los mayores valores de expresión del gen *PR1* (2.54 veces). Al transcurrir las 24 horas, los valores de expresión en las plantas

inoculadas con *B. subtilis* (CW+BMBA) se mantuvieron similares a los valores generados por esta misma bacteria a las 8 horas (1.50 veces), por el contrario, las plantas que fueron infectadas con las zoosporas de *P. capsici* (CW+Pc) incrementaron su expresión a 4.23 veces, no obstante, el incremento máximo se generó en la interacción planta-patógeno (CW+BMBA+Pc) (6.35 veces) (Figura 8A).

En el caso del gen *PR5*, los valores de expresión fueron más discretos con respecto al gen *PR1*. En este sentido, dicho gen (*PR5*) en las plantas que fueron inoculadas únicamente con *B. subtilis* (CW+BMBA) no se sobre expresó en ningún intervalo de tiempo (8 y 24 horas), por el contrario, en la interacción triple de planta-patógeno-bacteria (CW+BMBA+Pc) (Figura 11B), dicho gen presentó una sobre expresión de 1.91 veces únicamente a las 8 horas, quedando habita la expresión a las 24 horas. La expresión máxima del gen *PR5* fue de 2.4 veces a las 8 horas en las plantas del tratamiento CW+Pc. Sin embargo, estos valores de expresión fueron nulos a las 24 horas.

Adicionalmente, al evaluar cómo se modulaba la expresión del gen *EAS* en plantas de chile cv. C. wonder en respuesta a la interacción con microorganismos, se obtuvo que la inoculación de la bacteria *B. subtilis* (CW+BMBA) generó una sobre expresión discreta a las 8 y 24 horas de 1.7 y 1.5 veces respectivamente. En el caso de las plantas que se inocularon con *B. subtilis* y después fueron infectas con *P. capsici* (CW+BMBA+Pc) el gen *EAS* se sobre expresó 3.68 veces a las 8 horas, con una tendencia a disminuir ya que a las 24 horas la expresión fue de 3.38 veces. En el caso de las plantas que únicamente se infectaron con *P. capsici* (CW+Pc) la máxima expresión del gen *EAS* se alcanzó a las 8 horas con valores de 4.58 veces, dicha expresión disminuyó al transcurrir las 24 horas con un valor de 2.76 veces. Con base en estos resultados, se puede decir que los genes *PR1* y *EAS* participan de manera activa en el sistema de defensa de chile cv. C. wonder contra *P. capsici*, de igual forma el gen *PR5* forma parte de la respuesta de defensa temprana ya que su expresión solo se generó en las primeras horas de infección.

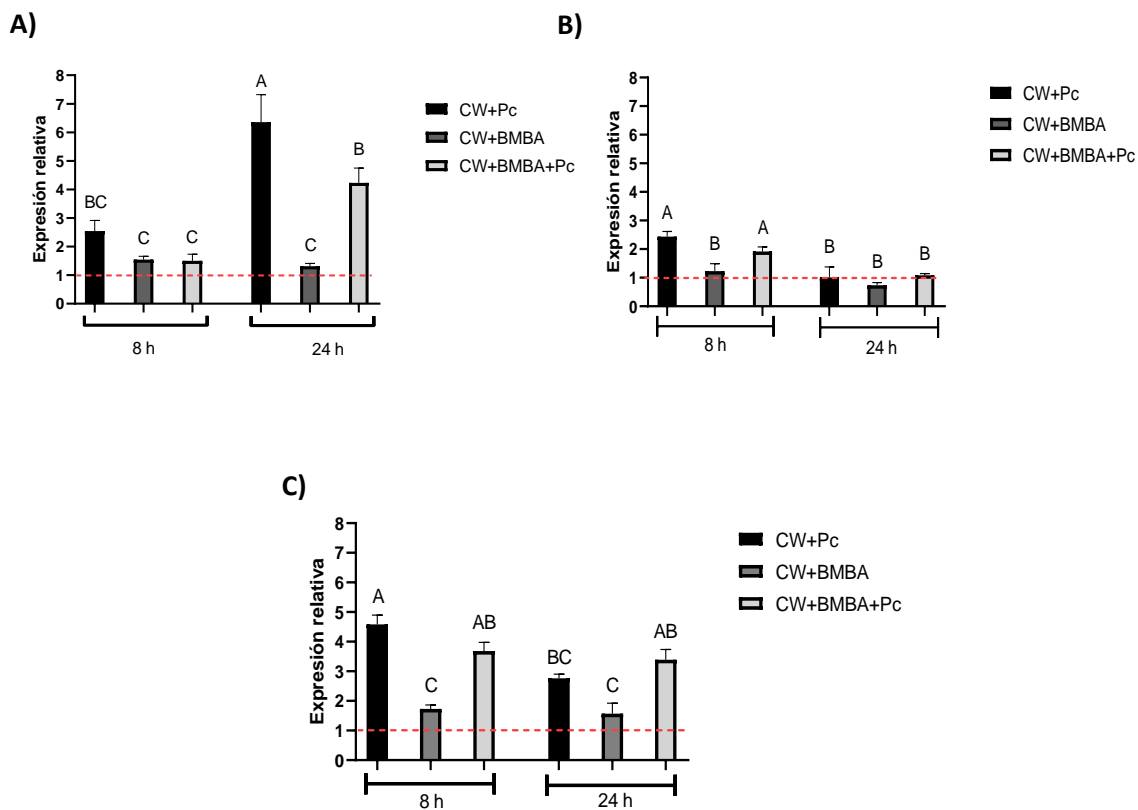


Figura 11. Acumulación relativa de genes asociados con patógenesis en raíces de plántulas de *C. woder* inoculadas con *B. subtilis* e infectadas con zoosporas de *P. capsici*.

Nota: Se muestran gráficos de los análisis de expresión a las 8 h y 24 h después de la inoculación de *P. capsici*.

A) Proteína relacionada con la patógenesis (PR1). B) Proteína relacionada con patógenesis (PR5). C) 5-epi-aristolóqueno sintasa (EAS); *P. capsici* (PC); *B. subtilis* (BS); *B. subtilis* más *P. capsici* (BSPC). Los datos se sometieron a un análisis de varianza Anova de una vía, seguido de una prueba *poshoc* de Tukey ($p \leq 0.05$). Las letras en los gráficos representan diferencia significativa.

3.4 Discusión

Al evaluar el efecto de las bacterias *Bacillus* sp. (BMBH), *Pseudomonas putida* (BMBI) *Bacillus amyloliquefaciens* (BMBC) y *Paenibacillus* spp. (BMBP), contra *P. capsici* (Pc) en plantas de chile C. Wonder (CW), se obtuvo que a partir del cuarto día después de la inoculación del patógeno, las plantas presentaron indicios de infección con diferentes niveles de severidad, alcanzando los máximos valores de infección al día 14 las plantas del tratamiento Control (CW+Pc) alcanzaron los valores máximos de infección que fueron en rangos de 5.66 hasta 6 (Tabla 5).

Con base en estos resultados se puede decir que estas bacterias no generaron un efecto protector contra zoosporas de *P. capsici*. Además, en el caso de *B. amyloliquefaciens* (CW+BMBC+Pc) no presentó una correlación entre el efecto antagónico *in vitro* contra *P. capsici* (previamente reportado) y, el efecto protector *in vivo* en plantas de cv. C. wonder. En este sentido, Romero et al. (2016), reportaron que bacterias que presentaron un potencial antagónico alto contra el patógeno *P. syringae* pv. tomate *in vitro*, no lograron proteger de la infección cuando se evaluaron en plantas de tomate, lo cual lo atribuyen al origen de las bacterias, ya que repercute en la falta de compatibilidad con el hospedante, así mismo, Whipps, (2001) señala que la falta de especificidad entre el hospedante y la bacteria, está en función de la capacidad fisiológica del microorganismo y, de las características metabólicas del hospedante. En este sentido, una de las principales limitantes del uso de microorganismos rizosféricos en el campo, es la capacidad de adaptabilidad de las bacterias a las condiciones climáticas, los diferentes tipos de suelo y las características de los cultivos en donde se desea inocular (Li y Kremer, 2006).

Investigaciones como la de Barriuso et al. (2008) reportaron que la bacteria rizosférica de *Bacillus* sp. I17 reducen el crecimiento vegetativo de plantas de *Pinus pinea*, este efecto lo atribuyen a la naturaleza química de los metabolitos que produce la bacteria, así como la abundancia química en que estos se producen, en conjunto generan este efecto negativo en la planta, otra de las hipótesis se centra en que las bacterias producen concentraciones altas de auxinas de tal manera que afectan negativamente el desarrollo vegetal.

Con base en estos supuestos, se sugiere que las bacterias de *Bacillus* sp., *Pseudomonas putida* y *Bacillus amyloliquefaciens* tienen un efecto neutro en las plantas de chile cv. C. wonder, ya que no generaron afectaciones en el crecimiento vegetativo, ni protegen de la infección por

zoosporas de *P. capsici*; lo cual se podría atribuir a una falta de especificidad entre el hospedante y las bacterias y, por consecuencia no se logran asociar con las plantas de C. wonder.

Por el contrario, las plantas inoculadas con *B. subtilis* (CW+BMBA+Pc) al día 14, presentaron un retraso en la infección por este mismo fitopatógeno, con un valor de severidad de 5.0. Investigaciones como la de Miguelez-Sierra et al. (2019), reportan que la cepa de *Pseudomonas chlororaphis* CP07, reduce la infección ocasionada por *P. palmivora* en plantas de cacao, mediante la activación de la respuesta sistémica inducida a través de la producción de compuestos como el 2,3-butanodiol y su precursor acetoina, en contraste con nuestros resultados, se sugiere que la bacteria *B. subtilis* podría producir acetoina, de tal manera que a través de este mecanismo puede inducir la activación de la defensa en las plantas y generar el retraso en la infección.

Se ha reportado que el ácido jasmónico (AJ) es una de las principales hormonas reguladoras de la respuesta sistémica inducida por microorganismos benéficos, no obstante, aún no se han dilucidado todos los elementos que participan en esta respuesta (Morrison, 2015). Por otro lado, el ácido salicílico (AS) generalmente se ha asociado en respuesta a infecciones por fitopatógenos, así como la expresión de genes de patogénesis *PR1* y *PR5* (Zarate et al., 2007). En este sentido, al realizar la inoculación de las zoosporas de *P. capsici* en las plantas de Chile, a partir de las 8 horas se tuvo un incremento en la expresión de los genes *PR1* y *PR5* lo cual indica que participan de manera activa durante los procesos de infección en las plantas de cv. C. wonder. Sin embargo, este sistema de defensa en la planta no es eficiente, ya que no logra contrarrestar las afectaciones por *P. capsici*. Estos resultados coinciden con los reportes de Reyes-Tena et al. (2021) donde dependiendo de la segregación genética de cada genotipo de Chile, así como de la concentración de inóculo del patógeno, las plantas presentaron diferentes niveles de susceptibilidad o resistentes a *P. capsici*.

Adicionalmente, son pocos los reportes en los cuales una bacteria benéfica mediante moléculas elicitoras puede inducir la resistencia sistémica en plantas a través de la sobre producción de hormonas como el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno. En este sentido, Wu et al. (2018b), reportaron que la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 producía compuestos extracelulares como fengicinas, bacilimicina D, surfactina bacillaeno, macrolactina, difficidina, bacilisina, 2,3-butanodiol y exopolisacáridos; los cuales participaron de manera directa en la inducción de resistencia sistémica en *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae* pv. tomate y

Botrytis cinérea, a través de la transcripción de las vías de señalización del ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno, además se moduló positivamente la expresión de manera diferencial de los genes de patogénesis *PR1*, *PR2* y *PR5*. En contraste con nuestros resultados, cuando únicamente se inoculó la bacteria en plantas de cv. C. wonder, éstas presentaron una expresión discreta del gen *PR1*, dicha expresión se mantuvo constante a las 8 y 24 horas, esto sugiere que *B. subtilis* genera una expresión permanente de dichos genes, ya que la inoculación de la bacteria se realizó 30 días previos a la determinación de la expresión. En el caso del gen *PR5* aunque no se encontraron indicios de que la bacteria indujera la sobreexpresión de dicho gen, con base en su comportamiento durante la infección con *P. capsici* (sobreexpresión solo a las 8 horas) no se descarta la posibilidad de que en las primeras horas de inoculación de la bacteria en la plántula se haya ocasionado la expresión de dicho gen.

Adicionalmente, otro de los genes evaluados fue *EAS* (5-epiriaristoliqueno sintasa) el cual se sobre expresó en cv. C. wonder a partir de las 8 horas. Se ha reportado que *EAS* en Chile es el principal precursor de la fitoalexina bicíclica capsidiol, compuesto importante para los sistemas de defensa en las plantas (Zavala-Paramo et al., 2000). Sin embargo, con base en los resultados obtenidos sugerimos que a los niveles que dicho gen se está sobre expresando no es suficiente para suprimir la infección por *P. capsici*.

Por otro lado, la expresión del gen *EAS* (5-epiriaristoliqueno sintasa) se ha asociado con una acumulación de la fitoalexina capsidiol en plantas de *Nicotiana tabacum* y *Capsicum annuum* como respuesta a la infección por fitopatógenos (Bohlmann et al., 2002). Sin embargo, recientemente se ha documentado que la molécula elicitora flagelina producida por *Bacillus amyloliquefaciens* induce la transcripción del gen *EAI* el cual codifica para la epi-aristoliqueno sintasa precursor del capsidiol en plantas de *C. annuum* (Rajamanickam & Nakkeeran, 2020). En contraste con nuestros resultados, después de 30 días de inoculación de *B. subtilis* las plantas de Chile presentaron una expresión del gen *EAS*, la cual fue constante a las 8 y 24 horas, lo cual indica que *B. subtilis* funciona como elicitor para inducir la expresión de *EAS* de manera permanente en las plantas de C. wonder.

Adicionalmente, las plantas que previamente fueron inoculadas con *B. subtilis* y posteriormente se infectaron con zoosporas de *P. capsici*; presentaron un retraso discreto en la infección con respecto al tratamiento Control, esto se podría atribuir a la actividad de *B. subtilis*, ya que indujo

la expresión de los genes de defensa *PRI* y *EAS*. En este punto, Chávez-Díaz, (2017), reportaron que los consorcios bacterianos de *P. putida* S4 / *P. tolaasii* A46 protegieron en un 90 % de la necrosis generada por *P. capsici* en plantas de chile pasilla. Así mismo, se indujo la expresión diferencial de los genes *EAS* (5-epi-aristolóqueno sintasa), *GLU* (PR-2 β -1,3-glucanasa básica), *PRI* (Proteína relacionada a patogénesis) y *POX* (PR-9 Peroxidasa), cabe señalar que la inoculación de las plantas se realizó tres veces (3×10^8 UFC), una al momento del trasplante, la segunda, al transcurrir los 20 días después del trasplante, y la tercera un día antes de inocular el patógeno, en comparación con nuestros resultados donde los niveles de expresión generados por las bacterias fueron discretos, no se descarta la hipótesis que al realizar una inoculación bacteriana a una mayor concentración, así como en mayor número de aplicaciones se puede incrementar la protección de las plantas de cv. C. wonder contra las zoosporas de *P. capsici* mediante el incremento de la expresión de genes de defensa como *PRI* y *EAS*

3.5 Conclusión

La inoculación de las bacterias de *Bacillus* sp, *P. putida*, *B. amyloliquefasciens*, *Paenibacillus* sp. mantuvieron un efecto neutro en las plantas de chile cv. *C. wonder*, ya que no generaron afectaciones en el crecimiento de las plantas, ni lograron proteger del ataque de *P. capsici*.

La inoculación de *B. subtilis* retrasó la infección por *P. capsici* en las plantas de cv. *C. wonder*, como resultado de la inducción de la expresión de genes de patogénesis (*PRI* y *EAS*). Lo cual indica que *B. subtilis* puede inducir la resistencia sistémica en plantas de *C. wonder* mediada por *PRI* y *EAS*.

3.6 Referencias

- Al-amodi, M. O. (2016). Fungi associated with seeds of ashford variety of groundnut grown in yemen and its disinfection *in vitro* using sodium hypochlorite. *Journal of Global Biosciences.*, 5(1), 3414–3422.
- Baba, V. Y., Powell, A. F., Suzuki, S. T. I., Pereira, L. F. P., Vanzela, A. L. L., Giacomini, R. M., Strickler, S. R., Mueller, L. A., Rodrigues, R., & Gonçalves, L. S. A. (2020). Capsidiol-related genes are highly expressed in response to *Colletotrichum scovillei* during *Capsicum annuum* fruit development stages. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14.
- Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97(2), 239–243. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0239>
- Barriuso, J., Ramos Solano, B., Santamaría, C., Daza, A., & Gutiérrez Mañero, F. J. (2008). Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5), 1298–1309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03862.x>
- Bohlmann, J., Stauber, E. J., Krock, B., Oldham, N. J., Gershenzon, J., & Baldwin, I. T. (2002). Gene expression of 5-epi-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuata* and *N. sylvestris*. *Phytochemistry*, 60(2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00080-8)
- Chávez-Díaz, I. F. (2017). Expresión de respuesta de defensa en chile jalapeño inoculado con agentes de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. In *Colegio de postgraduados*. http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1
- Che, M., Bouket, A. C., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Belka, M., Vallat, A., Rateb, M. E., Tounsi, S., & Triki, M. A. (2019). *Olea europaea* L. root endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 counteracts oomycete and fungal harmful pathogens and harbours a large repertoire

- of secreted and volatile metabolites and beneficial functional genes. *Microorganisms*, 7(9), 314.
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
- Ezziyyani, M., Hamdache, A., Egea-Gilabert, C., Requena, M. E., & M. E, C. (2017). Production of pathogenesis-related proteins during the induction of resistance to *Phytophthora capsici* in pepper plants treated with *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma harzianum* in combination compatible. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8, 4785–4795. <http://www.jmaterenvironsci.com>
- Hartmann, A., Klink, S., & Rothballer, M. (2021). Plant growth promotion and induction of systemic tolerance to drought and salt stress of plants by quorum sensing auto-inducers of the N-acyl-homoserine Lactone type: Recent developments. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683546>
- Hunter, S., Williams, N., McDougal, R., Scott, P., & Garbelotto, M. (2018). Evidence for rapid adaptive evolution of tolerance to chemical treatments in *Phytophthora* species and its practical implications. *PLoS ONE*, 13(12), e0208961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208961>
- Joo, G. (2005). Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, 27(3), 201–205.
- Katoch, S., & Singh, A. (2021). Screening of capsicum germplasm for resistance against *Phytophthora capsici* causing leaf blight and root rot. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(2), 627–630. <https://doi.org/10.22271/j.ento.2021.v9.i2i.8634>
- Khatun, A., Farhana, T., Sabir, A. A., Islam, S. M. N., West, H. M., Rahman, M., & Islam, T. (2018b). *Pseudomonas* and *Burkholderia* inhibit growth and asexual development of *Phytophthora capsici*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 73(3–4), 123–135. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0065>

- Lee, S. C., & Hwang, B. K. (2005). Induction of some defense-related genes and oxidative burst is required for the establishment of systemic acquired resistance in *Capsicum annuum*. *Planta*, 221(6), 790–800. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1488-6>
- Li, J., & Kremer, R. J. (2006). Growth response of weed and crop seedlings to deleterious rhizobacteria. *Biological Control*, 39(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.04.016>
- Migueluez-Sierra, Y., Acebo-Guerrero, Y., El Jaziri, M., Bertin, P., & Hernández-Rodríguez, A. (2019). *Pseudomonas chlororaphis* CP07 strain reduces disease severity caused by *Phytophthora palmivora* in genotypes of *Theobroma cacao*. *European Journal of Plant Pathology*, 155(4), 1133–1143. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01842-8>
- Moron-Rios, A., & Alayon-Gamboa, J. A. (2014). Productividad del cultivo de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) con manejo orgánico o convencional en Calakmul, Campeche, México. *Avances En Investigación Agropecuaria*, 18(3), 35–40.
- Morrison, L. (2015). Biosynthesis functions and role in plant development. In *Role of jasmonic acid in interaction of plants with plant growth promoting rhizobacteria during fungal pathogenesis* (pp. 33–66). <https://mail.google.com/mail/u/0/?pli=1%5Cpapers3://publication/uuid/D84FC782-E317-4880-B951-0697213436E1>
- Rajamanickam, S., & Nakkeeran, S. (2020). Flagellin of *Bacillus amyloliquefaciens* works as a resistance inducer against groundnut bud necrosis virus in chilli (*Capsicum annuum* L.). *Archives of Virology*, 165(7), 1585–1597. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04645-z>
- Raman, T., & Muthukathan, G. (2015). Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 241–252. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Reyes-Tena, A., Rodríguez-Alvarado, G., de Jesús Luna-Ruíz, J., Arreola-Romero, V., Arriaga-Solorio, K. L., Gómez-Dorantes, N., & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Tolerance to virulence phenotypes of *Phytophthora capsici* in pasilla pepper cultivars. *HortScience*, 56(10), 1239–1243. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15998-21>

- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2016). Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and biocontrol of tomato diseases. *Research in Microbiology*, *167*(3), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.11.001>
- Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A., Singh, U. B., Brahma Prakash, G. P., & Saxena, A. K. (2019). Antagonistic potential of bacterial endophytes and induction of systemic resistance against collar rot pathogen *Sclerotium rolfsii* in tomato. *Biological Control*, *137*, 104014. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104014>
- Sanogo, S. (2006). Predispositional effect of soil water saturation on infection of chile pepper by *Phytophthora capsici*. *HortScience*, *41*(1), 172–175. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.1.172>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*, *3*(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Segarra, G., Aviles, M., Casanova, E., & Borrero, C. (2013). Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. *Phytopathologia Mediterranea*, *52*(1), 77–83. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *52*, 487–511. https://doi.org/10.1093/jxb/52.suppl_1.487
- Wongpia, A., & Lomthaisong, K. (2010). Changes in the 2DE protein profiles of chilli pepper (*Capsicum annuum*) leaves in response to *Fusarium oxysporum* infection. *ScienceAsia*, *36*(4), 259–270. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.259>
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018b). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(5), 560–567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Xu, S., & Kim, B. S. (2016). Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* strain SC09-21 for biocontrol of *Phytophthora* blight and growth stimulation in pepper plants. *Tropical Plant*

Pathology, 41(3), 162–168. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0077-5>

- Yang, R., Fan, X., Cai, X., & Hu, F. (2015). The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper Phytophthora blight. *Biological Control*, 85, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.013>
- Zarate, S. I., Kempema, L. A., & Walling, L. L. (2007). Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology*, 143(2), 866–875. <https://doi.org/10.1104/pp.106.090035>
- Zavala-Paramo, G., Chavez-Moctezuma, M. P., Garcia-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., & Lozoya-Gloria, E. (2000). Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEASI*) from chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, 110(3), 410–418. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.1100316.x>
- Zhang, S., White, T. L., Martinez, M. C., Mcinroy, J. A., Kloepper, J. W., & Klassen, W. (2010). Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of Phytophthora blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control*, 53(1), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.015>