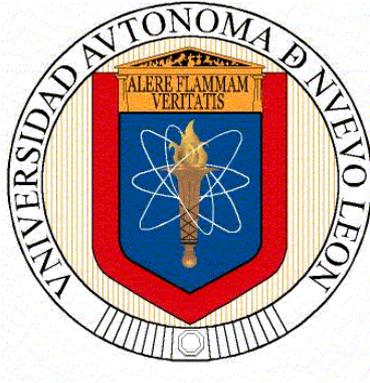


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



***Bacillus thuringiensis* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL COMPLEJO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annum* L.)**

Por

VIRGILIO MOJICA MARIN

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Biotecnología

Mayo de 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



***Bacillus thuringiensis* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DEL
COMPLEJO DE LA MARCHITEZ DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.)**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Especialidad en Biotecnología

Presenta

VIRGILIO MOJICA MARIN

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Hugo A. Luna Olvera
Director

Dr. Omar G. Alvarado Gómez
Director externo

Dr. Carlos Fco. Sandoval Coronado
Secretario

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Vocal

Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal

Dr. Carlos E. Hernández Luna
Vocal

San Nicolás de los Garza, N.L.

Mayo 2009

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera, intervinieron en la realización de esta investigación.

A la Universidad Juárez del Estado de Durango por el apoyo otorgado y las facilidades brindadas para la realización de mis estudios doctorales.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haber sido la Institución que directamente me formó hasta la obtención del grado de Doctor.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), por haberme otorgado la beca para la realización de mis estudios Doctorales.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera, por su valiosa dirección en el desarrollo de la presente investigación, además, por su confianza y apoyo siempre brindado.

A los siguientes Doctores integrantes de mi comité de tesis; Dr. Omar G. Alvarado Gómez, Dr. Carlos Fco. Sandoval Coronado, Dra. Lilia H. Morales Ramos, Dr. Benito Pereyra Alférez y Dr. Carlos E. Hernández Luna.

DEDICATORIAS

A mi hijo

Alan

A mi esposa

Nancy Alicia

A mi madre y padre

Lourdes Marin y Virgilio Mojica (†)

A mi tía

Maripaz Mojica

A mis suegros

Lupita y Eliseo Gonzalez Aguilar

Quienes saben que soy hombre de pocas palabras pero de profundos afectos. Diariamente intento con mis acciones demostrarles el profundo amor, respeto y cariño que por ellos albergo.

Y a todas aquellas personas que me han permitido compartir sus vidas y han sido parte muy importante en el diario perseguir de este nuevo reto que la vida me permitió enfrentar...gracias.

Por donde ando no olvido de quien labrador soy.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
TABLA DE CONTENIDO.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS DEL APENDICE.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Importancia del cultivo del chile.....	5
4.2 Generalidades de la marchitez del chile.....	6
4.3 Importancia de la marchitez del chile.....	7
4.4 Organismos causales de la marchitez del chile.....	8
4.4.1 Marchitez causada por <i>P. capsici</i>	8
4.4.2 Marchitez causada por <i>F. oxysporum</i>	11
4.4.3 Marchitez causada por <i>R. solani</i>	14
4.5 Control de la marchitez del chile.....	16
4.6 Calidad fisiológica y sanitaria de semillas.....	20
4.6.1 Germinación de la semilla.....	23
4.6.2 Viabilidad de la semilla.....	25

4.6.3 Germinación estándar.....	26
4.6.4 Germinación en charola “Bandeja speedling”.....	28
4.6.5 Vigor de la semilla.....	29
4.6.6 Envejecimiento acelerado.....	32
4.6.7 Sanidad de semillas.....	34
4.7 Aspectos históricos del control biológico.....	38
4.8 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	43
4.8.1 Principales mecanismos de acción de rizobacterias.....	45
4.9 <i>B. thuringiensis</i> como agente de control biológico de fitopatógenos.....	49
4.9.1 Actividad antifúngica de <i>B.thuringiensis</i>	50
4.9.1.1 Quitinasas y β -1, 3-glucanasas.....	50
4.9.1.2 Zwittermicina A.....	53
4.9.1.3 Cianida hidrogenada.....	54
5. MÉTODOS.....	56
5.1 Localización del experimento.....	56
5.2 Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos.....	56
5.3 Pruebas de calidad de la semilla de chile.....	59
5.3.1 Selección de la muestra.....	59
5.3.2 Germinación estándar.....	59
5.3.3 Germinación en charola “Bandeja speedling”.....	61
5.3.4 Envejecimiento acelerado.....	62
5.3.5 Pruebas de sanidad y germinación de semilla <i>in vitro</i>	64
5.4 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. Oxysporum</i>	66
5.4.1 Selección de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	66
5.4.2 Aislamiento de los hongos fitopatógenos.....	67
5.4.3 Determinación de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>	68
5.4.4 Efecto de <i>B. thuringiensis</i> sobre la germinación de semillas de chile.....	69
5.5 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i>	71

5.5.1 Producción de antibióticos volátiles.....	71
5.5.2 Filtrado de antibióticos.....	72
5.5.3 Termoestabilidad de antibióticos.....	74
5.5.4 Ensayo de plántulas <i>in vitro</i>	74
6. RESULTADOS.....	77
6.1 Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos.....	77
6.2 Pruebas de calidad de la semilla de chile.....	78
6.2.1 Germinación estándar.....	78
6.2.2 Germinación en charola bandeja speedling.....	82
6.2.3 Envejecimiento acelerado.....	82
6.2.4 Sanidad de semilla.....	87
6.3 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>	89
6.3.1 Efecto de <i>B. thuringiensis</i> sobre la germinación de semillas de chile.....	90
6.4 Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i>	99
6.4.1 Producción de antibióticos volátiles.....	99
6.4.2 Filtrado de antibióticos.....	100
6.4.3 Termoestabilidad de antibióticos.....	101
6.4.4 Ensayo de plántulas <i>in vitro</i>	102
7. DISCUSIÓN.....	104
8. CONCLUSIONES.....	114
9. RECOMENDACIONES.....	117
LITERATURA CITADA.....	119
APÉNDICE.....	145
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	148

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Determinantes bacterianos y tipos de resistencia inducida en el hospedero por agentes de control biológico.....	47
II. Algunos antibióticos producidos por bacterias.....	48
III. Cepas GM de <i>B. thuringiensis</i> usadas en los ensayos de antagonismo.....	66
IV. Cepas HD de <i>B. thuringiensis</i> usadas en los ensayos de antagonismo.....	67
V. Relación de fitopatógenos aislados e identificados en las plantas de chile colectadas en la zona productora del Estado de Durango, Méx.....	79
VI. Comparación de medias para la variable respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	80
VII. Comparación de medias para la variable de respuesta de germinación en charola en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	83
VIII. Comparación de medias para la variable de respuesta germinación después de tiempo de envejecimiento acelerado (24 horas) en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	84
IX. Incidencia (%) de hongos en semilla de 12 lotes de chile, detectados por el método de la placa de agar.....	88
X. Inhibición de <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxisporum</i> por cepas de <i>B. thuringiensis</i> (GM).....	91
XI. Inhibición de <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxisporum</i> por cepas de <i>B. thuringiensis</i> (HD).....	92
XII. Efecto de cepas <i>B. thuringiensis</i> en el crecimiento radial, tasa de	

	crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de <i>R. solani</i>	93
XIII.	Efecto de cepas <i>B. thuringiensis</i> en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de <i>P. capsici</i>	94
XIV.	Efecto de cepas <i>B. thuringiensis</i> en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de <i>F. oxysporum</i>	95
XV.	Efecto de cepas <i>B. thuringiensis</i> en la germinación de semillas de chile inoculadas con <i>R. solani</i>	96
XVI.	Efecto de cepas <i>B. thuringiensis</i> en la germinación de semillas de chile inoculadas con <i>P. capsici</i>	97
XVII.	Efecto de cepas <i>B. thuringiensis</i> en la germinación de semillas de chile inoculadas con <i>F. oxysporum</i>	98
XVIII.	Efecto de antibióticos volátiles secretados por <i>B. thuringiensis</i> en el crecimiento radial de <i>R. solani</i>	99
XIX.	Efecto de filtrados de antibióticos por <i>B. thuringiensis</i> en el crecimiento radial de <i>R. solani</i>	100
XX.	Efecto de antibióticos termoestables por <i>B. thuringiensis</i> en el crecimiento radial de <i>R. solani</i>	101
XXI.	Efecto antagónico de <i>B. thuringiensis</i> en el desarrollo de la enfermedad causada por <i>R. solani</i> y en el crecimiento de plántulas de chile.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Colecta de plantas con síntomas típicos de marchitez, de distintos tipos de chile en la zona productora del estado de Durango.....	57
2	Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos.....	58
3	Acondicionamiento de semillas de chile.....	60
4	Prueba de germinación estándar.....	61
5	Germinación en charola “Bandeja speedling”.....	62
6	Prueba de envejecimiento acelerado.....	63
7	Pruebas de sanidad y germinación de semilla de chile.....	65
8	Cepas de hongos fitopatógenos.....	67
9	Selección de cepas antagonistas de <i>B. thuringiensis</i>	68
10	Inhibición de crecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>F. oxysporum</i>	69
11	Efecto de <i>B. thuringiensis</i> sobre la germinación de semillas de chile.....	70
12	Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>R. solani</i>	71
13	Producción de antibióticos volátiles.....	72
14	Filtrado de antibióticos.....	73
15	Ensayo de plántulas <i>in vitro</i>	76
16	Respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile....	81
17	Respuesta de germinación estándar con envejecimiento acelerado en lotes de semilla de chile.....	86

LISTA DE TABLAS DEL APÉNDICE

Tabla		Página
I.	Análisis de varianza de la variable respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	145
II.	Análisis de varianza factorial y significancia de la variable de respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	145
III.	Análisis de varianza de la variable de respuesta germinación en charola “bandeja speedling” en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	146
IV.	Análisis de varianza de la respuesta envejecimiento acelerado en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	146
V.	Análisis de varianza factorial y significancia de la variable de respuesta de germinación con envejecimiento acelerado en lotes de semilla de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	147

LISTA DE SIMBOLOS

NOMENCLATURA

δ	Endotoxina
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
\pm	Mas menos
%	Porcentaje
μl	Micro litro
ADN	Acido desoxirribonucleico
AOSA	Asociación oficial de análisis de semillas
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CM	Cuadrado medio del error
cm	Centímetros
F	F-calculada
FV	Fuente de variación
g	Gramos
g/l	Gramos por litro
GL	Grados de libertad
GM	Grupos mexicanos
h	Horas
ha	Hectárea
HD	Howard Dulmage

HR	Humedad relativa
ISTA	Asociación internacional para pruebas de semillas
Kg	Kilogramos
M	Metros
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mL ⁻¹	Mililitros por litro
PGM	plantas genéticamente modificadas
PDA	Papa dextrosa agar
pH	Potencial de hidrogeno
ppm	Partes por millón
PsCI	Proteínas cristal insecticida
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SC	Suma de cuadrados
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
ufc	Unidades formadoras de colonias
v/v	Volumen sobre volumen
ZwA	Zwitermicina A

RESUMEN

La expansión de la marchitez del chile en nuevas plantaciones y diferentes zonas productoras de México y la dificultad en el control de la misma, obligan a desarrollar nuevas medidas de lucha que en el contexto de una estrategia de manejo integrado auspicien mejores expectativas para el control de la enfermedad. El presente trabajo abordó una investigación para determinar los patógenos relacionados y distribuidos naturalmente en chile cultivado en los diversos distritos agrícolas del Estado de Durango, con el interés de conocer la factibilidad de utilizar cepas antagonistas de *B. thuringiensis* como medio de control biológico. Para ello fueron muestreadas 44 diferentes localidades y tipos de chile en la zona productora del Estado de Durango, donde se encontró la presencia de varios hongos patogénicos al cultivo de chile; siendo las más frecuentemente aislados *R. solani*; *Fusarium* spp; *Verticillium* spp; *Colletotrichum* spp; *Sclerotium* spp. y *P. capsici*. Al evaluar los lotes de semilla de chile presentaron diferencias entre ellos en las pruebas de germinación estándar, germinación en charola bandeja speedling y envejecimiento acelerado. Los resultados de los análisis sanitarios de lotes de semillas demostraron la presencia de cuatro de los principales patógenos del cultivo de chile, *Alternaria* spp, *S. sclerotiorum*, *Fusarium* spp. y *R. solani*, así como de otros fitopatógenos, que de manera general no tuvieron influencia sobre el vigor y germinación de plántulas normales. Al evaluar y determinar la capacidad antagónica de 64 cepas de *B. thuringiensis* de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la FCB-UANL sobre *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* mediante enfrentamiento de cultivos duales en placas petri; fueron 16 las cepas de *B. thuringiensis* que redujeron

de manera significativa el crecimiento radial micelial de *R. solani*, 19 para *P. capsici* y ocho para *F. oxysporum*, después de tres días de incubación a 25°C. Por otra parte, estas cepas bacterianas se evaluaron en semillas de chile variedad Anaheim mediante pruebas de germinación bajo condiciones *in vivo*, donde se observó un incremento en el porcentaje de germinación en el caso del tratamiento de inoculación de *B. thuringiensis* sobre *R. solani*. De entre las 16 cepas probadas durante las pruebas de cultivos duales *in Vitro* contra “damping-off” y la pudrición del tallo y la raíz causada por *R. solani*, solamente seis de ellas fueron elegidas para ser analizadas simultáneamente en pruebas de antibióticos volátiles, termoestabilidad de los antibióticos y pruebas de germinación. En la prueba de antibióticos volátiles, las cepas GM-11 y GM-121 mostraron tener el mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *R. solani*. Ninguna de las cepas mostró un eficiente efecto antagonista durante las pruebas de termoestabilidad. En las pruebas de germinación, la mayoría de los aislamientos antagonistas GM-23, GM-11 y GM-121 fueron efectivos en la reducción de la infección de *R. solani*. Adicionalmente, la cepa GM-23 incrementó la longitud de las plántulas de chile. Estos resultados sugieren que las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas tienen un excelente potencial para ser usadas como agentes de biocontrol de *R. solani* en el cultivo del chile.

Palabras clave: *Bacillus*, control Biológico, antagonismo, fitopatógenos con origen en el suelo, germinación.

ABSTRACT

The wide spreading of pepper blight in new plantations on different areas of production in Mexico, force the researchers to develop new strategies of integrated management that support better expectations for the control of the disease. The present work is a research approach to determine the pathogens related and naturally distributed in pepper produced in some agricultural districts of Durango State with the interest to know the feasibility of using antagonistic stocks of *B. thuringiensis* as a strategy of biological control. Forty four different localities and several types of pepper were sampled in Durango State, where the presence of several pathogenic fungi to pepper production was observed; being more frequently isolated *R. solani*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Colletotrichum* spp., *Sclerotium* spp. and *P. capsici*. When evaluating the lots of seed of pepper displayed differences among them in the standard germination, germination in “speedling tray” and in accelerated aging tests. The results of the sanitary analyses of seeds lots demonstrated the presence of four of the main pathogens of the culture of pepper, *Alternaria* spp, *S. sclerotiorum*, *Fusarium* spp. and *R. solani*, as well as other phytopathogenic fungi that in general way did not have influence on seedling vigor and germination. When evaluating and determining the antagonistic capacity of 64 strains of *B. thuringiensis* from the International Collection of Entomopatogenic Bacillus from FCB-UANL against *R. solani*, *P. capsici* and *F. oxysporum* by dual culture assays, it was observed that 16 strains of *B. thuringiensis* reduced significantly the radial micellial growth of *Rhizoctonia solani* while 19 strains did the same for *P. capsici* and 8 strains for *F. oxysporum* after three days of incubation at 25°C. On the other hand, these 34 bacterial strains were evaluated in Anaheim variety pepper seeds by in vivo germination

tests where was observed an increase in the percentage of germination in the case of the treatment of inoculation of *B. thuringiensis* on *R. solani*. Among the 16 strains tested against damping-off and root and stem rot caused by *R. solani* during the *in vitro* dual culture assay only six of them were chosen to be screened simultaneously by antibiotics volatile, filtrates antibiotics, thermostability antibiotics and seedling assay. In the volatile antibiotics assay, the strains GM-11 and GM-121 showed the best inhibitory effect over *R. solani* growth. None of the strains showed an efficient antagonistic effect during the thermoestability assay. In seedling assay, majority of the antagonistic isolates GM-23, GM-11 and GM-121 were effective in the reduction of *R. solani* infection. In addition, GM-23 increased the length of pepper seedlings. These results suggest that the *B. thuringiensis* strains studied have an excellent potential to be used as biocontrol agents of *R. solani* in chili pepper.

Key words: *Bacillus*, biological control, antagonism, soil borne plant pathogens, germination.

1. INTRODUCCIÓN

En México el chile (*Capsicum annuum* L.) es el cultivo hortícola más importante considerando la superficie que se siembra. En la actualidad, entre los factores más importantes que limitan su producción se encuentran los fitopatógenos provenientes del suelo entre los cuales los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Phytophthora* spp; causan una enfermedad conocida comúnmente como tristeza o marchitez del chile, su presencia se ha reportado en todos los estados productores de chile en México. Las pérdidas estimadas a nivel nacional oscilan entre un 10 y un 60% mientras que en áreas específicas del Bajío y Puebla pueden alcanzar el 100%. Se han utilizado diversos métodos para controlar esta enfermedad siendo las prácticas culturales y el control químico los más empleados, aunque en los últimos años el control biológico ha tomado una gran relevancia. El género *Bacillus*, independientemente de su ubicación taxonómica, se encuentran entre los agentes más elegibles para el control biológico debido a cualidades tanto morfológicas como fisiológicas que permiten su ubicuidad en la naturaleza, además de la creciente lista de éxitos obtenidos en la prevención de patologías vegetales causadas por hongos, además *B. thuringiensis* es el organismo más exitoso en cuanto a comercialización se refiere el cual produce un cuerpo paraesporal denominado δ -endotoxina, formada por una o varias proteínas cristal insecticida (PsCI), tóxicas para lepidópteros, dípteros, coleópteros, nemátodos y protozoarios. Sin embargo, su potencial antifúngico es desconocido, a pesar de su

especificidad, virulencia, seguridad y potencia contra organismos blanco y a la gran diversidad de metabolitos que produce, entre los que destacan, bacteriocinas, antibióticos y enzimas extracelulares como proteásas y quitinazas, elementos clave en el fenómeno de supresión de patógenos por agentes biológicos. El presente trabajo abordó una investigación para determinar los patógenos relacionados y distribuidos naturalmente en Chile cultivado en los diversos distritos agrícolas del Estado de Durango, con el interés de conocer la factibilidad de utilizar cepas antagonistas de *B. thuringiensis* como medio de control biológico.

2. HIPOTESIS

Se pueden seleccionar cepas GM y HD de *Bacillus thuringensis* con capacidad de suprimir a los hongos patógenos relacionados con el complejo de la marchitez del chile.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

El presente estudio se realizó con el propósito de evaluar y determinar *in vitro* e *in vivo* el potencial antagónico de cepas GM y HD de *Bacillus thuringiensis* de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la FCB-UANL, sobre los patógenos relacionados al complejo de la marchitez del chile.

3.2 Objetivos particulares

Aislar e identificar en semillas y plantas de chile a los hongos patógenos causantes de la marchitez del chile en diferentes localidades de la zona productora de chile del estado de Durango.

Seleccionar y evaluar el potencial de cepas GM y HD de *B. thuringiensis* con capacidad de interaccionar antagónicamente con cepas de hongos patógenos causantes de la marchitez del chile en la zona productora de chile del estado de Durango, utilizando diferentes métodos de escrutinio *in vitro* y valorando dicho efecto *in vivo*.

4. ANTECEDENTES

4.1 Importancia del cultivo del chile

La producción mundial de chile (*Capsicum annuum* L.) es de 29 millones de toneladas al año, el cultivo del chile es el cultivo hortícola más importante en México, con una producción anual aproximada de 1.8 millones de toneladas (FAOSTAT, 2007).

China es el principal productor con 12'531,000 ton/año, aportando con esto más de la mitad de la producción mundial, México ocupa el segundo lugar con 1'853,610 ton/año. Actualmente Zacatecas es el principal productor de chile con cerca del 60% de la producción nacional, le siguen San Luis Potosí, Durango, Guanajuato, Jalisco y Michoacán (CONAPROCH, 2006); se estima que cada hectárea dedicada a este cultivo genera entre 200 y 350 jornales/año (Pozo, 2004). Aunque tradicionalmente se ha considerado a esta región como productora exclusiva de chile seco (ancho, mirasol, pasilla, guajillo, de árbol, cola de rata, etc.), se observa una tendencia a cultivar una superficie mayor con tipos de chile de consumo en fresco como Bell, Inferno, jalapeño, güeros, etc.

Sin embargo, esta diversificación en cuanto a los tipos de chile cultivados en la región no ha contribuido sosteniblemente a reducir el problema fitopatológico más grave que enfrenta el cultivo de chile conocida como la marchitez o pudrición de la

raíz del chile (Rincón y Velásquez, 1999), cuyos síntomas se manifiestan por la marchitez de las hojas y la pudrición del fruto o de la raíz, puede afectar a las plantas en cualquier etapa de desarrollo y la severidad de los síntomas está asociada con la condiciones climáticas (Cano-Alvarado, 1998).

La marchitez del chile es causada principalmente por los hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia* y por el oomiceto *Phytophthora capsici*, que se destaca por su prevalencia e incidencia, y es considerado el principal factor limitante para la producción de chile en el mundo (González-Pérez *et al.*, 2004).

4.2 Generalidades de la marchitez del chile

Se le denomina marchitamiento a la etapa en la que las plantas pierden vigor y sus tejidos, hojas, tallos o frutos pierden la turgencia normal (García, 1984) por su naturaleza, puede ser de origen fisiológico, el cual es ocasionado por condiciones de escasa humedad en el suelo o exceso de evapotranspiración, también puede tener un origen patológico el cual principalmente está caracterizado por una necrosis del sistema radical o del cuello de las plantas (Chávez *et al.*, 1994), este tipo marchitamiento por lo general es irreversible.

El primer reporte de la enfermedad a nivel mundial fue dada por Leonian en 1922 en Nuevo México estableciendo como agente causal a *Phytophthora capsici*, y en nuestro país, fue reportada por primera vez en 1944 por el Servicio de Cuarentenas de los EEUU, al detectar el patógeno en chiles procedentes de México. El Dr. Galindo en 1956 descubrió su presencia en plantas de chile de los campos de la

E.N.A. Chapingo, México y pueblos aledaños; por su sintomatología típica este mismo autor llamó a la enfermedad “Marchitez del chile” (Romero, 1988).

En los últimos años ha habido varios reportes que señalan a *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. como patógenos asociados con el síndrome (Duran-Ortiz *et al.*, 2001; Espinoza-López *et al.*, 2001; Guerrero-Aguilar *et al.*, 2001; Rico-Guerrero *et al.*, 2001; Velázquez, 2001; López-Vásquez *et al.*, 2002), los cuales hay que considerar ya que ambos patógenos están asociados con daños a la raíz en diferentes cultivos.

Los resultados de las investigaciones hechas hasta el momento, sugieren que *Phytophthora* y *Fusarium* son los principales causantes del daño y *Rhizoctonia* solo es un hongo oportunista que se alimenta del tejido muerto. Una de las hipótesis que se maneja es que *Phytophthora* es el patógeno que entra primero a la planta y esto facilita la entrada a los otros dos, es probable que para obtener una variedad tolerante a este síndrome será necesario conjuntar en ella resistencia a *P. capsici* y *Fusarium* sp., pero esto habrá que corroborarlos con muestreos a nivel nacional además de algunos otros trabajos adicionales (González *et al.*, 2001).

4.3 Importancia de la marchitez del chile

Esta enfermedad se encuentra presente en todo el mundo, en México se le considera la enfermedad causada por hongos más importante de este cultivo, se ha reportado su presencia en todos los estados productores de chile en donde las condiciones ambientales son favorables para su desarrollo. La época de mayor incidencia de la enfermedad ocurre a partir de floración (alrededor de junio) que

coincide con la generalización de las lluvias, y se acentúa en parcelas con deficiente nivelación y que además reciban riego por gravedad, aunque continúa siendo un problema serio en parcelas tecnificadas con deficiente manejo del riego por goteo (Rincón y Velásquez, 1999), particularmente en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (Redondo, 1974; García *et al.*, 2000; Guigon y González, 2001).

La incidencia pandémica de esta enfermedad en las regiones productoras causa cada año pérdidas directas e indirectas de magnitud variable, entre un 40 y un 70% de las plantas muere cada año a causa de la enfermedad (Rincón y Velásquez, 1999) e influye directamente en la programación de la superficie a establecer en el siguiente ciclo de cultivo. En México existen regiones en donde se tienen pérdidas hasta del 80% y estados como Aguascalientes y San Luis Potosí donde la superficie de siembra de chile se ha reducido hasta un 60% a causa de este problema (SAGAR, 1999).

4.4 Organismos causales de la marchitez del chile

4.4.1 Marchitez causada por *P. capsici*

Este patógeno tiene una extensa distribución en el suelo, se encuentra asociado a cultivos como berenjena, tomate y cucurbitáceas (Leonian, 1922, Jee *et al.*, 2000), *Phytophthora blight* y/o *Phytophthora root rot* es causada por el patógeno *Phytophthora capsici* Leonian y es la enfermedad más devastadora del cultivo del chile en campo e invernadero, ocasionando grandes pérdidas estimadas entre el 30 y

el 80% de la producción mundial anual (Kui *et al.*, 2008), sobre todo cuando los factores climáticos y edáficos son propicios para su desarrollo.

Ayvar *et al.*, (1994), reportan a *P. capsici* como el principal causante de la muerte de plantas de chile en pre floración, floración y en llenado de frutos. A nivel nacional se estima una disminución en la densidad de plantación de entre el 10 y el 60% (Pérez *et al.*, 1990), pérdidas del 80% en los estados de San Luis Potosí y Aguascalientes (Mendoza y Pinto, 1983) y de hasta el 100% de mortalidad en zonas como el Bajío y Puebla (Chávez *et al.*, 1994).

Alexopoulos *et al.*, (1996), clasifican a este patógeno de la siguiente manera:

Reino.....Stramenophyla
Phyllum.....Oomycota
Clase.....Oomycetes
Orden.....Peronosporales
Familia.....Pythiaceae
Género.....*Phytophthora*
Especie.....*capsici*

La enfermedad puede presentarse en cualquier estado fenológico del cultivo y todas las partes de la planta son susceptibles al ataque. La pudrición del cuello y la marchitez en general son los síntomas más comunes, caracterizados por una coloración café oscuro del tallo, la cual se extiende del suelo hacia arriba, acompañada por una marchitez súbita de la planta, sin que el follaje se torne amarillo. El agua salpicada por la lluvia o el riego es la responsable de acarrear el

inóculo a la parte superior de la planta, provocando pudrición de tallos y frutos, además de manchas foliares (Lowell *et al.*, 1993).

Las lesiones en la parte superior del tallo son de color café oscuro y se presentan principalmente en las ramas, causando la muerte de la parte de la planta localizada inmediatamente arriba de donde se presentó la lesión. En las hojas se forman áreas circulares o irregulares verde oscuro, de consistencia acuosa, que con el tiempo se tornan de color castaño claro. El daño en frutos, se manifiesta inicialmente con puntos aguanosos de coloración oscura, que rápidamente invaden al fruto en su totalidad (Leonian, 1922).

Weber (1932), agrega a lo anterior, que la semilla de los frutos también se ve afectada y que al abrirlos se puede observar el micelio sobre éstas, además de manchas de coloración parda en la cutícula. *P. capsici* es una especie heterotálica; produce micelio hialino, cenocítico, muy ramificado y toruloso cuando es joven, el cual al envejecer se vuelve liso y las colonias crecen en forma radial. Los esporangióforos simples o ramificados irregularmente, son gruesos, robustos, con un ligero hinchamiento cerca de la base del esporangio. Los esporangios pueden ser globosos, oval-alargados o elípticos, algunos tienen vacuola central, miden 28-123 μ x 21-50 μ , la relación longitud por anchura es 1.7:1.0; presentan papila prominente, a veces desviada, frecuentemente hay esporangios con dos papilas.

Las clamidiosporas son raras o ausentes (Alexopoulos y Mims, 1979). Esta especie produce oosporas heterotálicas y apleróticas, miden 31.5 μ de diámetro, son lisas, producidas en oogonios esféricos, lisos, fertilizados por anteridios anfiginos

(Romero, 1988). Alta humedad en el suelo y temperaturas oscilantes entre 15 y 20°C son condiciones favorables para su diseminación, los cultivos regados por gravedad son más afectados ya que los propágulos se diseminan a través del agua de riego (Ayvar *et al.*, 1994) y pueden transmitirse por medio de los implementos utilizados en las prácticas culturales y por medio de la semilla (Flores y Frías, 1992).

La oospora, que representa la fuente de inóculo primario, germina y da lugar a una esporangio, el cual puede germinar directamente o dar lugar a zoosporas; las zoosporas se enquistan en la superficie de las raíces o de las hojas y el tubo germinativo produce un apresorio, el cual se fija a la superficie y ejerce presión física, en pocos minutos las hifas inician su crecimiento en las células de la epidermis del hospedero (Alexopoulos y Mims, 1979).

4.4.2 Marchitez causada por *F. oxysporum*

F. oxysporum es uno de los fitopatógenos nativos del suelo más ampliamente distribuidos y sin duda de mayor importancia, la especie *oxysporum* es la de mayor distribución y la que tiene un mayor número de hospederos (Romero, 1988). En México esta especie fue identificada por Crispín *et al.*, (citado por Virgen, 1990), quienes lo reportan como el principal problema patológico de cultivo del chile en las zonas productoras de Durango y Zacatecas, donde ocasiona pérdidas de hasta el 60 % de la producción. Álvarez (2003), considera que en el estado de Sinaloa, sin un programa de manejo adecuado, las pérdidas pueden superar el 90 %.

Alexopoulos y Mims (1979), clasifican a este patógeno de la siguiente manera:

Reino.....Mycetae

División.....Amastigomycota

Subdivisión.....Deuteromycotina

Clase.....Deuteromycetes

Sub Clase.....Hyphomycetidae

Orden.....Moniliales

Familia.....Tuberculariaceae

Género.....*Fusarium*

Especie.....*oxysporum*

La marchitez clásica causada por *F. oxysporum* empieza con una ligera clorosis del follaje superior, que progresa en pocos días a una marchitez permanente con las hojas adheridas, para cuando estos síntomas son visibles, el sistema vascular de la planta se encuentra irremediamente dañado, particularmente el tallo inferior y las raíces primarias, mientras que el tejido cortical permanece intacto. Generalmente, la enfermedad aparece en áreas del campo donde un alto porcentaje de las plantas mueren, aunque también se pueden presentar plantas dispersas o aisladas (Ayvar *et al.*, 1994).

Al realizar un corte transversal del tallo, principalmente en la parte baja, se puede observar una coloración café oscura del tejido vascular, las plantas en éstas condiciones presentan un achaparramiento, las hojas se marchitan, mueren y caen al

suelo, puede producir algunos frutos aunque de mala calidad y finalmente la planta muere (Mendoza, 1996).

Este hongo forma hifas hialinas, septadas y ramificadas; produce tres tipos de esporas asexuales. Los microconidios son hialinos, elipsoides, uni o bicelulares. Los macroconidios son hialinos, falcados, con tres a cinco septas, pueden ser producidos en esporodoquios. Las clamidiosporas son de pared gruesa, redondas, de forma intercalar o terminalmente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo (Romero, 1988). *Fusarium* se encuentra naturalmente en el suelo en forma de clamidiospora, micelio asociado a fragmentos de tejidos vegetales o a partículas de humus y las clamidiosporas representan la fuente de inóculo primario (Álvarez, 2003).

Muerto el hospedero se desarrolla un micelio algodonoso que esporula sobre la superficie del tejido, donde produce una gran cantidad de microconidias, macroconidias y clamidiosporas, especialmente en condiciones de alta humedad (León, 1982).

El organismo requiere para su desarrollo óptimo, en medio de cultivo 27°C y para la infección de 20 a 30°C, la enfermedad declina apreciablemente arriba de 30°C; *F. oxysporum* tiene la capacidad de invernar sobre residuos orgánicos o en el suelo como organismo de vida libre, de esta forma puede sobrevivir en él hasta 16 años, aún en ausencia de plantas hospederas (Huang y Sun, 1978).

El hongo puede ser introducido a zonas libres del patógeno por medio de semillas, plántulas para trasplante, arados, rastras, el hombre, ganado, etc. (Walker, 1952). El hongo infecta al hospedero por la penetración de la hifa a través de las raíces de las plantas, principalmente por la zona meristemática y por la epidermis de la zona de elongación y maduración de la raíz, también a través de heridas causadas por factores físicos y biológicos (Dixon, 1981).

El micelio progresa intracelularmente, para luego entrar en los tubos del xilema, dentro del cual el patógeno puede diseminarse en el tallo; en plantas adultas los vasos se llenan con micelio y goma densa, además de un gran número de tilosas, provocando un taponamiento de los tejidos conductores (Melhus y Kent, 1979).

4.4.3 Marchitez causada por *R. solani*

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en los suelos agrícolas del mundo, afectando a una amplia gama de cultivos, entre ellos al chile (Schwartz y Gálvez, 1980). De las diversas especies del género *Rhizoctonia*, destaca por su importancia fitopatológica *R. solani*, ya que se sabe que ocasiona más tipos diferentes de enfermedades a una gran variedad de tipos de cultivos, en la mayor parte del mundo y bajo las más diversas condiciones ambientales (Gormely, 1980).

Agrios (1985), menciona que este hongo causa enfermedad en todo el mundo, ocasionando pérdidas en la mayoría de las plantas anuales, incluyendo a las malas hierbas, a casi todas las hortalizas, árboles forestales, cultivos mayores, plantas perennes, arbustos y árboles frutales.

Alexopoulos y Mims (1979), clasifican a este patógeno de la siguiente manera:

Reino.....Mycetae
División.....Amasigomycota
Subdivisión.....Deuteromycota
Clase.....Deuteromycetes
Orden.....Aganomycetales
Género.....*Rhizoctonia*
Especie.....*solani*

R. solani causa una marchitez típica de plantas en almácigo, cuyos síntomas no se distinguen fácilmente de aquellos causados por *Pythium*, la diferencia más notable es que los tallos de las plántulas infectadas por *R. solani* son de color pardo, más oscuro que los tallos de color paja de las plántulas infectadas por *Pythium* (Roberts y Boothroyd, 1978).

Los síntomas pueden variar dependiendo del cultivo e incluso entre plantas de la misma especie, dependiendo de la etapa fenológica y de las condiciones climáticas (Agrios, 1985). En las fases iniciales de infección de las raíces, pueden formarse chancros circulares u oblongos, deprimidos y limitados por márgenes de color café, al avanzar la infección los chancros aumentan de tamaño y se vuelven rojizos de textura seca y el crecimiento de la planta se retarda (Christon, 1962). Las plantas con pudriciones radicales muestran varios síntomas, como el amarillamiento y muerte de las hojas inferiores; a medida que el tiempo transcurre, este amarillamiento se generaliza en toda la planta (Gallegos, 1978).

Hooker (1990), señala que una de las características más típicas del micelio de *R. solani* son sus ramificaciones en ángulo recto (90 grados), con ligeras constricciones en el punto de origen de la ramificación, formación de un septo en la rama cercana a su origen, el micelio es casi siempre de color café o castaño oscuro. Las hifas son algo gruesas y cuando jóvenes tienen sus células multinucleadas y se ramifican cerca de la septa distal de la célula.

El inóculo de *R. solani* consiste de esclerocios y micelio que sobrevive como saprófito en el suelo, su diseminación es a través del agua de riego, el viento, material vegetal, semillas contaminadas y por implementos agrícolas (Bolkan, 1980). Cuando *R. solani* se encuentra creciendo como saprófito, los exudados que secretan las semillas en germinación y las raíces de plantas hospederas lo estimulan a infectar los hipocotilos y raíces jóvenes (Martinson, 1965). El hongo penetra a través de la cutícula y epidermis en forma mecánica, inicialmente produce un cojinete de infección a partir del cual emite clavijas de infección o mediante hifas individuales; además puede penetrar por aberturas naturales de la raíz o por heridas (Campos, 1987).

4.5 Control de la marchitez del chile

Desde el descubrimiento de esta enfermedad los trabajos para controlarla se han enfocado en *Phytophthora* sp; por lo que se han hecho numerosas investigaciones tanto en México como en el extranjero: sobre su control químico (Pérez *et al.*, 1990; Parra y Ristaino, 2001), biológico y cultural (Hoitink y Fahy, 1986; Casarrubias y

Frías 1992; Chávez *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 1996; Nemeč *et al.*, 1996; Yáñez, 1997).

Se han realizado esfuerzos considerables para encontrar los agentes de control biológicos para esta enfermedad y varios candidatos potenciales han sido reportados incluyendo: *Actinomyces* spp. (Zhu *et al.*, 1995; Lee y Hwang, 2002; Hee *et al.*, 2006; Ezziyyani *et al.*, 2007), *Pseudomonas* spp. (Lee *et al.*, 2003 a,b,c; Jung y Kim, 2004; Paul y Sarma, 2006), *Bacillus* spp. (Dai y Guan, 1999; Lee y Hwang, 2002; Jung y Kim, 2003; Qiu *et al.*, 2004; Jung y Kim, 2005), *Trichoderma* spp. (Liu y Lu, 2003; Ezziyyani *et al.*, 2007) y algunos hongos endófitos (Kim *et al.*, 2007).

Desde 1966 se han desarrollado en México variedades resistentes a *Phytophthora capsici* (Heredia, 1966). En la década de los 80's resurgió esta idea tomando fuerza con el descubrimiento de 19 criollos resistentes a *P. capsici* originarios del estado de Morelos. Entre ellos sobresalía el "Criollo Morelos-334" (CM-334) porque exhibía consistentemente un alto grado de resistencia al patógeno (Guerrero-Moreno y Laborde, 1980; Gil Ortega *et al.*, 1991) estos materiales junto con algunos introducidos de otros países como "línea 29", 'USDA PI201232', 'USDA PI201234 fueron usados ampliamente en México y en el mundo para generar variedades resistentes (Smith *et al.*, 1967; Redondo, 1974; Bosland y Lindsey, 1991; Mercado y Bustamante 1993; Lefebvre y Palloix, 1995, 1996; Tamietti *et al.*, 1998; Walke y Bosland. 1999; Thabuis, 2001).

Durante el ciclo primavera-verano del 2000 se evaluó la reacción a pudrición de la raíz de seis líneas avanzadas de chiles tipo mirasol y ancho en comparación con

materiales criollos; los valores más reducidos del área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad fueron los que mostraron las líneas de chile mirasol, denominadas LEMZ-7, LEMZ-8 y LEMZ-10 (Velásquez-Valle *et al.*, 2003). La evaluación de líneas y/o colectas de chile para la detección de resistencia a la pudrición de la raíz bajo condiciones naturales se llevó a cabo en Calera, Zac. y Rincón de Romos, Ags. durante los ciclos agrícolas de 1999 y 2000, se evaluaron 102 líneas y/o colectas de diferentes tipos de chile; en 1999 se identificaron 13 y 62 líneas en Calera y Pabellón respectivamente, con incidencia de la enfermedad menor al 25%. Sin embargo, en la evaluación del 2000 todas las colectas o líneas con la característica anterior mostraron incidencia igual o superior a 60%, incluyendo una colecta del Criollo de Morelos. En Rincón de Romos, Ags., 22 líneas mostraron incidencia menor o igual a 25% aunque la incidencia en el resto de los materiales evaluados osciló de 42 a 100%.

La elección del mejor fungida químico resulta complicado debido a que los patógenos pertenecen a reinos y órdenes diferentes. Existen trabajos o investigaciones para cada patógeno por separado, Chávez *et al.*, (1994) evaluaron diversos fungicidas y abonos orgánicos, determinando que para la región de Puebla la incorporación de gallinaza y la aplicación de Fosetil-Al, presenta los resultados más alentadores en el control de *P. capsici*.

Romero (1988), recomienda para la prevención de *P. capsici*, la inmersión de la raíz de las plántulas para trasplante en una solución de 1,000 ppm de Metalaxil. Pérez *et al.*, (2003) evaluaron la sensibilidad de cepas de *P. capsici*, aisladas de plantas de chile del estado de Guanajuato, a los fungicidas Azoxystrobin, Metalaxyl,

Propamocarb y 2tiocianometil benzotiazol (TCMTB) y encontraron que este último inhibe completamente el crecimiento micelial, no así los otros tres productos.

Mendoza (1996), recomienda para el control de *R. solani*, aplicaciones a partir de la aparición de los botones florales dirigidas al cuello de la planta con Captán o Quintoseno, o inyecciones de Pencycurón, cuando se observen las primeras plantas afectadas. Satija y Hooda (1987), evaluaron diferentes fungicidas bajo condiciones de invernadero para el control de *F. oxysporum* y obtuvieron los mejores resultados con aplicaciones de Captafol y Oxycloruro de Cobre.

Mendoza (1996), sugiere para la prevención de *F. oxysporum*, la inmersión de la raíz de las plántulas para trasplante, en una solución de 2,000 ppm de Thiabendazol o Benomyl, los cuales aportan un período de protección de 30 días, después de los cuales hay que realizar aplicaciones dirigidas a la base del tallo o inyectado al sistema de riego presurizado.

Desafortunadamente, con los medios de control químico con que se cuenta actualmente no se ha alcanzado el éxito deseado y la enfermedad sigue causando grandes pérdidas en el país. Se realizó un diagnóstico de este problema en la región centro de México, donde se concluye que son varias las causas por las que no se ha podido controlar éste problema, entre las que destacan: a) Desconocimiento del patosistema en el sentido de que exista algún elemento no considerado hasta ahora, como podrían ser: otros patógenos (*Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp.) involucrados en el síndrome; b) Gran variabilidad del o los patógeno(s); c) Deficiente manejo del cultivo y d) Falta de información técnica (SIHGO, 2000).

Bajo esta perspectiva, para resolver este problema es necesario conocer la presencia, distribución y variabilidad del o los patógenos involucrados en el problema. Además, se debe establecer un programa de mejoramiento efectivo, basado en la búsqueda de resistencia natural, implementando estrategias que permitan coleccionar, conservar, caracterizar y aprovechar fuentes de resistencia genética presentes en la gran diversidad de chiles que posee México, principalmente en sus materiales criollos y silvestres.

Actualmente, la tendencia entre los productores de Chile se orienta hacia la aplicación de fumigantes mediante el riego por goteo en condiciones de acolchado previo al trasplante, como una medida destinada a disminuir la población de patógenos en el suelo, y de esta manera evitar o reducir el daño por esta enfermedad. Además, se registra una importante preferencia entre los productores de Chile hacia el empleo de productos con agentes de control biológico de los hongos mencionados, aunque no se tengan evidencias completas o locales de su efectividad en la supresión de la enfermedad.

4.6 Calidad fisiológica y sanitaria de semillas

El hombre en su afán de obtener productos vegetales diversos que satisfagan sus necesidades de alimentación, vestido y otros de mayor o menor importancia se ha visto en la necesidad de alterar lo que antes eran los ciclos naturales de los cultivos afectándolos de tal manera que se han producido o desatado un sin fin de factores que alteran, no siempre de manera deseable, los niveles de productividad de los

mismos. Entre estos factores juegan un papel de gran importancia las enfermedades de las plantas (De la Isla, 1994).

La comercialización así como el intercambio de recursos genéticos y la introducción de nuevos cultivos trasladando semilla a distintos ambientes, ha constituido la principal fuente de diseminación de patógenos entre las distintas zonas agrícolas. Los microorganismos evolucionan como respuesta a los estímulos de su entorno de manera que se aseguren de cubrir sus necesidades biológicas y con ello aseguren su supervivencia, perpetuación y diseminación. Una de sus estrategias de supervivencia y diseminación es el parasitar la semilla y el hombre al introducir esas semillas en nuevas zonas de cultivo disemina el microorganismo (Jiménez, 1997).

El 90 por ciento de los cultivos destinados a la alimentación humana y animal requiere del uso de semillas lo que las convierte en el principal insumo para la producción de alimentos de origen vegetal (Agarwal y Sinclair 1987). Siempre se ha considerado que las enfermedades de las plantas cultivadas constituyen una seria amenaza para la producción de alimentos, desde el momento de la siembra hasta el consumo de los productos cosechados. Debido a la importancia de las semillas como insumo de la producción agrícola es importante el desarrollo continuo y progresivo de la investigación en el área de patología de semillas de las diversas especies cultivadas a nivel mundial.

En este sentido, la investigación se ha enfocado principalmente en algunos pocos cultivos económicamente importantes (comerciales). La Asociación Internacional para Pruebas de Semillas (ISTA, 1985) ha desarrollado pruebas para evaluar la

calidad de las semillas. Estas pruebas requieren ser adaptadas para semillas de otras especies vegetales cultivadas a menor escala y que paulatinamente han venido adquiriendo mayor importancia.

En México se ha calculado que la disminución del 30% de los cultivos se debe principalmente a daños causados por insectos, malas hierbas, roedores y enfermedades, y son éstas últimas las responsables del mayor porcentaje de la cifra total (De la Isla, 1994). La calidad de las semillas constituye el factor más importante para una buena cosecha, asumiendo que el buen manejo del proceso productivo y que el tipo de medio ambiente sean los óptimos.

Para la producción económica de cualquier cultivo es de vital importancia tener semillas de alta calidad que permitan obtener un buen establecimiento, desarrollo y rendimiento final. Para muchos agricultores una semilla de calidad es aquella que germina y está libre de organismos indeseados, como hongos, bacterias y virus. Sin embargo, el concepto es mucho más amplio y comprende diversos factores tales como los propuestos por (McDonald y Copeland, 1997): pureza genética y física, sanidad (libre de malezas, hongos, insectos) y potencialidad de viabilidad, germinación y vigor.

La calidad de la semilla se refiere tanto a la calidad genética y a la calidad de la semilla que llevan esos genes. Un cultivo de chile genéticamente puro es importante para obtener y mantener muchos atributos en la cosecha, incluyendo la producción, forma de la fruta, tamaño y color. La calidad de la semilla también afecta grandemente la germinación y vigor de las plantas de los almácigos de chile.

Comprar semillas de chile genéticamente puras y de alta calidad puede ayudar a aumentar los beneficios del agricultor. Muchos productores de chile encuentran que el aumento en el precio de semilla de más alta calidad es una de sus mejores inversiones. Los productores de semilla de chile que han seleccionado continuamente sus mejores plantas tendrán un mayor potencial, beneficios de cosecha y uniformidad que será pasada de generación a generación a través de la semilla por una constante reelección y aislamiento (Bosland y Votava, 1999).

4.6.1 Germinación de la semilla

La germinación se define como la etapa que va desde la emergencia y desarrollo de una plántula hasta el aspecto de las estructuras esenciales que provienen del embrión y que reflejan su capacidad para originar una planta bajo condiciones favorables de temperatura, humedad relativa y luz (ISTA, 1999).

Las pruebas de germinación nos dan información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plántulas normales. Además, estas pruebas permiten hacer comparaciones del poder germinativo entre diferentes lotes de semilla de la misma especie (Arcos *et al.*, 1998). Las semillas viables no siempre germinan cuando se exponen a las condiciones óptimas para su germinación, tales semillas tienen un periodo persistente de latencia.

Para que se lleve a cabo la germinación de las semillas es necesario lo siguiente:

- a) La semilla debe ser viable, es decir, tener embrión vivo y capaz de crecer;
- b) No deben existir barreras físicas, químicas o fisiológicas para la germinación y
- c) La semilla debe estar expuesta a las condiciones ambientales apropiadas, disponibilidad

de agua, temperatura adecuada, provisión de oxígeno y en ocasiones luz (Bustamante, 1997).

Los métodos de laboratorio han sido desarrollados de tal manera que sea posible controlar la mayoría de las condiciones externas. Esto permite obtener resultados uniformes y rápidos sobre la germinación de muestras de semillas de una determinada especie, para lo cual se han estandarizado las condiciones controladas de las pruebas de germinación (Moreno, 1984). Copelan y McDonald (1985), califican a estas plántulas en las pruebas de germinación en plántulas normales, plántulas anormales (ausencia de radícula, ausencia de epicotilo, ausencia de cotiledones o plántulas deforme, etc.) y semillas muertas.

Existen tres conceptos que caracterizan el deterioro de las semillas: a) el proceso del deterioro es inevitable; b) el proceso del deterioro es irreversible y c) el deterioro varía entre una población de semillas a otra. Estos puntos se ven reflejados directamente en la baja germinación (McGee, 1998).

El proceso de reanudación del crecimiento activo del embrión que se realiza en la semilla viable puede ser afectado por diversos factores como: la humedad de la semilla, temperatura, factores genéticos, presencia de hongos, daño mecánico y factores agronómicos. Las prácticas deficientes, la maduración de las semillas, humedad del suelo, variedades y estado de nutrición de la planta madre también influyen en la madurez de las semillas, que a la vez influyen en el periodo de almacenamiento (Bustamante, 1997).

Otras de las causas de la pérdida de semilla en el país son la reducción de vigor y viabilidad a nivel bioquímico que son difíciles de determinar, ya que las semillas muestran una gran diversidad de respuestas ante el deterioro (Vázquez, 1990).

4.6.2 Viabilidad de la semilla

La viabilidad se ha definido como la capacidad de germinación bajo condiciones adecuadas. Las semillas viables pueden o no germinar inmediatamente. Las semillas con latencia son viables y requieren de tiempo o tratamiento específicos para que estas puedan germinar (Vázquez, 1990).

El ADN deberá entonces sufrir un proceso de reparación al principio de la germinación, inmediatamente después de la entrada de agua, para asegurar su funcionalidad. Se tienen evidencias de que dos enzimas claves del mecanismo de reparación del ADN, la ADN polimerasa y la ADN ligasa, pierden actividad cuando las semillas se han deteriorado. La actividad de ambas enzimas se recupera conforme la germinación avanza, sin embargo, podrían estar ausentes en momentos críticos cuando la expresión de algunos genes es vital (Vázquez, 1990).

La ruptura del ADN debe ser en principio un fenómeno netamente aleatorio, con rupturas en cualquier lugar y en cualquier célula. Algunas semillas habrán acumulado daños en regiones críticas del ADN y no germinarán, mientras que otras tendrán más suerte y podrán subsistir al daño (Vázquez, 1990).

4.6.3 Germinación estándar

La germinación en el laboratorio es el desarrollo de las estructuras esenciales del embrión a un grado tal que manifiestan la habilidad para continuar un desarrollo normal bajo condiciones óptimas. Es decir que es la capacidad de las semillas para germinar y producir una plántula normal (ISTA, 1985).

Tanto Peretti (1994) como Elis y Copeland (1997), establecen que la prueba de germinación estándar es el método principal y más aceptado para calificar un lote de semillas, ya que evalúa la viabilidad y germinación de ellas bajo condiciones estándares favorables. El objetivo de esta prueba es determinar el máximo potencial germinativo; información que más tarde puede ser usada para comparar la calidad de diferentes lotes y también estimar el valor de las plántulas en el campo (ISTA, 1999).

Copeland y McDonald (1985), afirman que la capacidad de germinación es el criterio comúnmente usado para determinar la viabilidad o calidad de la semilla y que es universalmente aceptado por los productores de semillas que la germinación y la viabilidad de la semilla son considerados términos sinónimos. Estos autores definen la germinación como la emergencia y desarrollo a partir del embrión de aquellas estructuras esenciales, que por el tipo de semilla de que se trate, son indicadoras de su habilidad para producir una plántula normal bajo condiciones favorables (AOSA, 1983).

De acuerdo a la ISTA (1985), el objetivo de la prueba estándar de germinación es obtener información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plántulas normales y hacer comparaciones del poder germinativo entre diferentes

lotes de semilla de la misma especie. Sin embargo, bajo condiciones de campo la prueba de germinación normalmente no da resultados satisfactorios al no obtenerse confiabilidad y repetitividad (Delouche, 1973; ISTA, 1985); por lo cual la apreciación del vigor se efectúa mediante el primer conteo de germinación, el cual es considerado uno de los primeros ensayos indirectos para estimar el vigor de las semilla; aun cuando este pierde confiabilidad debido a las dificultades de estandarización, no obstante estas pueden ser superadas si se controlan las condiciones cuidadosamente (Perry, 1987).

Con relación a la prueba estándar, Cobaquil (1991), evaluó lotes de semillas de maíz, antes de envejecerlas no encontró diferencia significativa entre lotes para el primer conteo de germinación y otras variables, sin embargo, observó que estos valores fueron menores a germinación estándar, y aun más bajos después del envejecimiento artificial.

Por su parte Jara (1993), al evaluar lotes de semilla de trigo, no encontró diferencia significativa entre ellos en el primer conteo, pero si mostró tener mayor sensibilidad que la germinación total para detectar vigor.

Andrew (1987), menciona que el vigor de la semilla a nivel de germinación incluye la velocidad y germinación total, gama de condiciones del medio ambiente, tales como: temperaturas y humedad bajo las cuales la germinación ocurrirá, y la resistencia a enfermedades.

De acuerdo con Sayers (1982), la prueba de germinación se diseñó para medir el máximo potencial de viabilidad de las semillas, y señala que se han establecido

criterios para evaluar las plántulas al final de un período específico para determinar si poseen las estructuras necesarias para producir plantas normales, de aquí que la prueba requiera de las condiciones óptimas para obtener todo el potencial de germinación normal de la semilla.

Para determinar la capacidad de germinación de acuerdo con lo recomendado por (ISTA, 1985), comúnmente se utiliza como sustrato el papel, los cuales pueden tener la forma de papel de filtro, secante o toallas. De los cuales deben reunir ciertas características: Composición de madera, algodón u otra celulosa vegetal purificada, debe estar libre de hongos, bacterias y sustancias tóxicas, textura porosa y abierta, las raíces deben crecer sobre y no dentro del papel, deben ser resistentes pues no se debe rasgar cuando se manipula, capacidad para retener humedad suficiente durante todo el ensayo y finalmente un pH de 6.0 a 7.5.

4.6.4 Germinación en charola “Bandeja speedling”

A partir de los años 90 la producción de algunos cultivos, como el tomate comenzó a verse amenazada por la incidencia de varias enfermedades vírales, transmitidas por la mosca blanca del tabaco *Bemisia tabaci* (Nava *et al.*, 1996,1998). Esto ha promovido la producción de plántulas bajo condiciones de aislamiento, con el fin de protegerlas del vector de la enfermedad mediante la utilización de mallas antiáfidos o antitrips, lo que permite obtener plantas libres de geminivirus (Hilje, 1997).

La aparición de enfermedades y el alto costo de las semillas mejoradas genéticamente, hacen necesaria la utilización de sistemas de producción de plántulas

en bandejas de alvéolos utilizando además sustratos enriquecidos con fertilizantes, éstas medidas permiten mejorar el aprovechamiento de las semillas con respecto al almácigo tradicional, además de mejorar la sanidad de las plántulas (Castilla, 1995).

4.6.5 Vigor de la semilla

Las semillas que son capaces de desarrollar la raíz durante la germinación, pueden no tener el vigor para establecer una plántula bajo condiciones de campo. Siendo el vigor un indicador de la calidad de la semilla que denota la completa habilidad de las semillas para funcionar bien bajo condiciones de campo. ISTA (1981), menciona que Nobbe en 1876 reconoció que las propiedades de cada semilla, tales como la velocidad de germinación y crecimiento de la plántula varían dentro de cada lote de semilla, así como entre lotes diferentes.

El vigor es un concepto muy apreciado por los investigadores y se demanda su inclusión como un criterio más de calidad en la comercialización de semillas, debido a su importancia en el contexto del comportamiento en campo. No obstante, en particular este término es aún complejo y por lo mismo poco utilizado, sin embargo, investigadores y asociaciones que trabajan al respecto han sugerido una serie de pruebas de carácter físico, fisiológico y bioquímico que permiten evaluar el vigor de la semilla. En el “manual de vigor” (AOSA, 1983) se hace referencia a varios investigadores que según sus propias conceptualizaciones convergen y relacionan al vigor con la velocidad de germinación y la habilidad de desarrollar plántulas en condiciones desfavorables.

A través del tiempo se han hecho intentos de definir el término de vigor de la semilla, lo cual ha incluido conceptos como “adecuado establecimiento de plantas bajo condiciones desfavorables de campo” (Isely, 1950), rapidez de germinación (Delouche y Caldwell, 1960), rapidez de germinación y uniformidad bajo condiciones favorables de campo (McDonald, 1975), fuerza de desarrollo, velocidad de germinación (Copeland y McDonald, 1985), potencial de emergencia y capacidad de establecimiento en campo (Tao, 1979).

Miranda (1984), afirma que el vigor es considerado desde que la semilla alcanza su madurez fisiológica en la planta, y es el punto donde convergen el máximo peso seco, viabilidad y el más alto vigor de la semilla, y a partir de la cual como lo manifiesta McDonald (1975, 1977), la pérdida de vigor precede a la pérdida de la germinación y la viabilidad. En su congreso de 1950 la ISTA acordó que los ensayos de germinación serían desarrollados universalmente sobre medios inertes y que cualquier ensayo destinado a obtener resultados de una magnitud similar en el suelo se denominaría “ensayos de vigor”.

En 1977 el comité de ensayos de vigor de la ISTA en su congreso definió al vigor de la semilla como la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel de actividad y capacidad de la semilla o lote de semilla durante su germinación y emergencia de plántula, asumiendo que semillas con buen comportamiento se denominan de alto vigor y aquellas de un comportamiento pobre, se considera de bajo vigor (Perry, 1980).

Por otro lado, la AOSA (1983), a través de su Comité de Vigor define al vigor como “la suma total de propiedades de la semilla que determinan el potencial para la rápida y uniforme emergencia y desarrollo de plántulas normales bajo un amplio rango de condiciones de campo”.

El vigor de la semilla es un indicador de la calidad más allá de la germinación, de aquí que el valor principal del concepto vigor y su evaluación es el resultado de su aplicación a la siembra en el campo (Perry, 1980). Moreno (1984), agrega que el valor de evaluar el vigor de la semilla radica en la predicción del comportamiento de un lote de semillas, cuando las condiciones del medio ambiente no son del todo favorables para la germinación y emergencia de plántulas, en segundo, el valor de comparar el potencial biológico en cuanto a vigor de lotes de semilla con porcentajes de germinación similares.

Por su parte Filgueiras (1981), cita que el vigor de semilla es especialmente importante debido a que proporcionan cierta seguridad anticipada de la uniformidad de plantación y competencia completa de manera que se controle el tamaño del producto, uniformidad de maduración y cosecha.

Se ha generado gran cantidad de investigación en el desarrollo de pruebas que midan el vigor de semillas (Jonson y Wax, 1978), con el objetivo de identificar lotes capaces de una rápida y uniforme emergencia de plántulas en el campo, así mismo lotes con una alta capacidad de emergencia en condiciones ambientales desfavorables para completar la prueba de germinación (Matthews y Powell, 1981).

4.6.6 Envejecimiento acelerado

El envejecimiento acelerado permite predecir el potencial de almacenamiento de algunas semillas y la emergencia en el campo (Delouche y Baskin, 1976) y a su vez supera los problemas de sensibilidad de la prueba de germinación y de muestreo (Ellis y Roberts, 1980) para calificar vigor de semillas.

Perry (1980), menciona que el deterioro es una de las diversas causas que pueden disminuir el vigor de la semilla y que la técnica de producción de semillas deberá identificar y minimizar la velocidad a la cual ocurre el deterioro, el cual está en función del contenido de humedad de la semilla de la temperatura y del tiempo.

Algunos procesos que se asocian con el deterioro son la reducción de la actividad enzimática, de la tasa respiratoria y de su velocidad de crecimiento de las plántulas. Cuando las temperaturas son altas el punto de equilibrio es de 40°C y la atmósfera está saturada de agua, la pérdida de vigor y viabilidad pueden ser muy rápidas. Delouche y Baskin (1976), establecen que los procesos de deterioro bajo envejecimiento acelerado son similares a los que se realizan en condiciones normales, solo que el grado de deterioro se ve enormemente incrementado por la exposición a niveles muy adversos de humedad relativa y temperatura en tiempos cortos.

McDonald (1975 y 1977), al comentar sobre la prueba, menciona que tiene algunas ventajas como su simpleza y bajo costo, su conducción no requiere equipo adicional a la cámara de envejecimiento acelerado y la interpretación de los resultados se basa sobre la ya familiar prueba de germinación, por lo cual demanda

entrenamiento especial. Además la prueba es rápida, requiere pocos días adicionales, comparada con la rutina de la prueba de germinación estándar.

No obstante Ellis y Roberts (1980), mencionan que al ser trasladada la técnica a una prueba o una evaluación de rutina de las semillas, se pasó por alto una diferencia muy importante, la longevidad de la semilla, que es mucho más sensible a pequeños cambios de humedad y temperatura, por lo cual da como resultados su desventajas. Esta prueba tiene como principio el someter semillas a alta temperatura y humedad relativa por periodos cortos de tiempo con el fin de determinar su resistencia al deterioro por medio de la reducción de la germinación con relación al potencial fisiológico inicial de las mismas y relacionar la germinación después de envejecimiento con emergencia en campo bajo condiciones ambientales normales.

En trabajos realizados de envejecimiento acelerado en semillas de cebolla el tiempo de exposición al estrés fué significativo y negativamente correlacionado, ya que a medida que éste aumenta disminuye el vigor de la semilla (Doijode, 1985); Amaral (1983), manifiesta que el vigor de la semilla relacionado a condiciones de campo, se estima en forma más precisa cuando éstas son sometidas a un periodo de 48 h a temperaturas de 42 a 45°C y un 100% de H.R. según la especie, antes de la prueba de germinación; los tiempos que determinó fueron 44 h para semillas de arroz, soya, cebolla, sorgo, trigo 72 h y chícharo 48 h.

Sin embargo, Baskin (1987), para semilla de trigo sugiere 45°C y 48 h. Mientras que Krishnasamy y Seshu (1990), en 68 cultivares de arroz observaron que luego de someterlos por 8 días a 43°C y 100% de H.R. la capacidad de germinación fluctuó

de 3 a 83%. Asimismo al evaluar el potencial de pruebas de vigor en lotes de semillas de trigo, Jara (1993) encontró que la prueba de envejecimiento acelerado (48 h) fué la que mejor detectó correlación con emergencia en campo.

4.6.7 Sanidad de semillas

Los daños que ocurren por una asociación de patógenos en las semillas dan como resultado pérdidas directas a la población de plantas en el campo y pueden causar daños irremediables en todo el sistema agrícola (Machado, 2000). Para la reducción de estos daños, el reconocimiento de las enfermedades es esencial para el éxito de las empresas agrícola. Los especialistas son necesarios para proveer el conocimiento en un diagnóstico, sin embargo, la presencia de un especialista en un área de producción y el tiempo que se requiere para un buen diagnóstico no siempre se encuentran disponibles (Mahaman *et al.*, 2003).

Dentro de este contexto, es necesario el conocimiento así como la evaluación de la calidad y sanidad de las semillas para evitar grandes pérdidas de tiempo, trabajo y producción el cual tienen gran impacto económico tanto del productor como del sistema agrícola. Según la ISTA la variabilidad en la evaluación de los resultados de las pruebas de sanidad de las semillas en los diversos laboratorios alrededor del mundo, es la falta de conocimiento del laboratorista en reconocer los patógenos asociados a las semillas la cual es generalmente la causa principal de la discrepancia entre los resultados (Neergaard, 1979).

Durante el desarrollo de la semilla, esta puede ser invadida o contaminada por diversos patógenos. Las enfermedades que afectan a las semillas en muchas

ocasiones pasan desapercibidas durante sus etapas iniciales y cuando uno se percata de su presencia ya es muy tarde para aplicar algún método de control. Una de las ramas de la fitopatología que en los últimos años ha ido adquiriendo mayor importancia es la patología de semillas. Sin embargo, en México existen pocas investigaciones sobre patógenos transmitidos por semilla.

Aunque las pérdidas causadas por las enfermedades en semillas no han sido bien cuantificadas, Agarwal y Sinclair (1987), mencionan que las pérdidas globales debido a enfermedades en planta se estiman en un 12 por ciento del potencial de producción. Se dice que un patógeno es transmitido por semillas cuando aquel es llevado dentro o sobre la semilla, penetrando sus tejidos y permanece en ella en estado de reposo, de modo que al sembrarla, la infección en la planta provendrá de la semilla infectada. Otros patógenos contaminan la semilla a nivel superficial o están mezclados con ellas, pero esto no implica necesariamente que las semillas la transmitan.

Entre los patógenos asociados a semillas se pueden encontrar hongos, bacterias, virus y nematodos. Por otra parte, se tienen evidencias de que las semillas juegan un papel importante en la diseminación de enfermedades de la planta de un lugar a otro y que algunos patógenos pueden vivir por años alojados en o sobre la semilla. La mayoría de los cultivos alimenticios del mundo son sembrados por semillas; para que un cultivo tenga un buen inicio es necesario que la semilla este en óptimas condiciones (Agarwal y Sinclair, 1987).

Las principales enfermedades transmitidas en semilla de chile se encuentra *Colletotrichum capsici* en donde los primeros reportes de este hongo afectando a la semilla de chile fueron en Madras y Bihar Assam (Chodwdhary, 1957), donde la enfermedad se presentó en tres fases: 1) Ennegrecimiento de las plántulas, o damping off. 2) Manchas en hojas, originadas en diferentes estados de crecimiento. La infección se inicia en los pedúnculos de los frutos, posteriormente continúa en las ramificaciones donde el avance es gradual, invadiendo completamente las ramas. Las ramas principales también son infectadas. Es más evidente cuando la invasión es cercana al estado de floración. 3) Los síntomas presentan manchado y/o pudrición de los frutos rojos, una decoloración, reducción de la calidad y en la producción.

Chowdhary en 1957 reportó que cerca del 12 a 32% de los frutos fueron afectados por *Colletotrichum capsici* en Assam (Siddiqui *et al.*, 1977). Mridha y Siddique (1989), indicaron que los hongos causan pudrición, no solo afectan sino que reducen la calidad de los frutos y que pueden transmitirse a través de la semilla.

Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en suelos y sustratos orgánicos, por ejemplo, han sido aislados del *permafrost* en el ártico hasta de las arenas del Sahara y abunda en suelos cultivados de zonas templadas y tropicales y es el hongo más frecuentemente aislado por los fitopatólogos (Booth, 1971).

Fusarium es ampliamente reconocido por sus macroconidias fusiformes distintivas, sin embargo, a pesar de esta característica primaria hay muchas dificultades para delimitar el género utilizando la morfología para alcanzar conceptos filogenéticos consistentes (Summerell *et al.*, 2001).

Este hongo se encuentra frecuentemente en los aislamientos de las semillas de chile. *F. oxisporum* afecta directamente a la semilla de chile reduciendo el porcentaje de germinación y crecimiento. Cuando el hongo se presenta en plántula provoca marchitamiento al momento del trasplante y cuando alcanza su desarrollo es muy común encontrarlo en pudriciones de fruto (Vidhyasekaran y Thiagarajan, 1981).

Rhizoctonia solani Kuhn es uno de los hongos que más frecuentemente causan el damping off en plántulas, puede degradar o desintegrar la semilla. Los primeros reportes que se tienen es que se encontró en las semillas de frijol, donde el micelio y esclerocios fueron localizados en el pericarpio debido a que las vainas estuvieron en contacto con el suelo.

Evidencias de que *R. solani* se transmite por semilla de chile (*Capsicum frutescens* L.) fueron reportadas en el Sur de California (E.U.A.) en el periodo de 1936-1945, donde más de 500 ha de chile fueron afectadas. Se detectó la presencia del hongo en las semillas en los invernaderos. Los suelos fueron pasteurizados lo cual redujo las pérdidas por damping off en los semilleros comerciales pero a pesar de estas medidas se siguieron presentando muchas plántulas enfermas por este hongo (Baker, 1947).

Leonian (1922), indicó que cuando la infección con *P. capsici* está confinada a la cubierta de la semilla no interfiere en la germinación de la misma. En México, Villapudua (1977) reportó que aparentemente el hongo se encuentra en la semilla en forma de micelio, aunque se inoculen dos cepas compatibles del hongo, si las condiciones ambientales y el contenido de humedad en la semilla no le son

favorables no sobrevivirá por más de un mes, concluye que el micelio en las semillas de chile no dura de una estación de cultivo a otra.

En estudios realizados por Datar (1995), se encontraron seis hongos que causaban pudrición en fruto de chile (*Capsicum annuum* L.) estos fueron: *Altenaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Dechslera australiensis* y *Colletotrichum capsici*. En la India la patogenicidad de éstos hongos se probó en frutos a diferentes temperaturas de 0 a 5°C no se produjo pudrición, de 10 a 25°C el daño fue reducido y entre 20 a 30°C hubo desarrollo de hongos con capacidad de podrir los frutos.

4.7 Aspectos históricos del control biológico

Los términos “control biológico” y su sinónimo abreviado “biocontrol” han sido empleados en diferentes campos de la biología, mas notablemente en entomología y en patología vegetal. En entomología, se ha usado para describir el uso de insectos predadores vivos, nemátodos entomopatógenos o patógenos microbiales para suprimir o eliminar poblaciones de diferentes plagas de insectos. En patología vegetal, el término se emplea al uso de antagonistas microbiales que supriman o controlen enfermedades así como al uso de patógenos de hospederos específicos para controlar malezas (Pal y McSpadden, 2006).

Aunque el término más apropiado pareciera “manejo biológico”, dado que el uso de la palabra “control” significa tener dominio sobre algo, y respecto a enfermedades de la raíz, se está muy lejos de ello, en este escrito se acepta la corriente dominante del uso del término control, en virtud de que se reconoce el origen entomológico del

concepto, materia en la cual, efectivamente, en la mayoría de los casos se logra el dominio de la situación parasítica. Se acepta también que el término es en general más usado; de hecho, la búsqueda en bases de datos de bibliografía empleando “manejo biológico” no rinde información (Bautista *et al.*, 2008).

En una revisión de los aspectos históricos sobre el estudio de la patología de plantas realizada por Ainsworth en 1981, éste comenta que el concepto de control biológico fue usado por primera vez por Von Tubeuff en 1914, con una interpretación bastante amplia del control de un organismo por otro, excluyendo al hombre. También menciona que Roberts en 1874, acuñó la palabra “Antagonismo” dentro de la microbiología al demostrar la acción antagónica que sufría una bacteria al interaccionar con cepas de *Penicillium glaucum*. Asimismo, menciona que Potter, en 1908 fué el primero en reportar la inhibición de patógenos de plantas por metabolitos de otros organismos.

La primera definición de control biológico en fitopatología fue acuñada por Baker and Cook en 1974 que lo definieron como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o dormante, por uno o más organismos, que se logra de manera natural o a través de manipulación del ambiente, el hospedante, el antagonista, o por introducción en masa de uno o más antagonistas”.

Tiempo después la definición fue cambiada a: “La reducción de la cantidad de inóculo o de las actividades inductoras de enfermedad de un patógeno que se logra

mediante la acción de uno o más organismos además del hombre” (Cook y Baker, 1983).

En 1987 la Academia Nacional de Ciencias de E.E.U.U. definió al control biológico, según Erwin y Ribeiro (1996), como: “El uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir el efecto de organismos indeseables (plagas) y favorecer organismos deseables como cultivos, árboles, animales e insectos y microorganismos benéficos”.

Gabriel y Cook (1990), mencionaron que el control biológico debe incluir organismos (hiperparásitos y antagonistas) naturales o genéticamente modificados por recombinación genética y genes o productos de genes, así como hospederos resistentes.

En general, las definiciones de control biológico, cuanto más recientes más enfatizan el enfoque reduccionista, respecto al enfoque holístico. Los miembros del Consejo de Investigación Nacional de los E.E.U.U. consideraron los progresos biotecnológicos modernos y se refirieron a control biológico como “el uso de organismos, de genes o de productos naturales o modificados del gen, capaces de reducir los efectos de organismos indeseables y de favorecer organismos deseables tales como insectos benéficos y microorganismos”, pero esta definición generó discusiones subsecuentes y con frecuencia era considerada demasiado amplia por los científicos que trabajan en este campo de la investigación (Congreso de los E.E.U.U. 1995).

El control biológico en Fitopatología ha buscado la introducción y establecimiento generalmente de solo un aislamiento de determinada cepa antagonista que, en grandes cantidades, es introducido en el suelo contra uno o varios fitopatógenos con origen en el suelo (Papavizas, 1981; Berger *et al.*, 1996; Larena *et al.*, 2002; Jacobsen *et al.*, 2004).

Sin embargo, debido a la homeostasis del suelo no es frecuente lograr el establecimiento del antagonista (Gindrat, 1979) y el control biológico con este enfoque no ha resultado exitoso. La introducción de antagonistas comenzó a ser practicada en la agricultura en 1927 y desde entonces, de cientos de antagonistas identificados como candidatos potenciales solo algunos han sido formulados para uso comercial en enfermedades. De estos pocos, apenas el 5% de tales agentes han conseguido su objetivo (Desai *et al.*, 2002).

Los trabajos con antagonistas reportados como exitosos bajo condiciones de laboratorio e invernadero (Papavizas, 1981; Berger *et al.*, 1996; Larena *et al.*, 2002) no lo han sido en campo. Bajo condiciones de campo raras veces se ha conseguido el control eficiente de fitopatógenos (Suslow y Schroth, 1982; Schippers *et al.*, 1987; Capper y Higgins, 1993) y pocos agentes de control biológico han mostrado estabilidad en la práctica comercial a pesar de los muchos trabajos publicados.

Los que se han reportado como exitosos bajo condiciones de campo no muestran estabilidad y no logran establecerse en el mercado de productos para el manejo de enfermedades, principalmente por la variabilidad de las condiciones ambientales en

el campo que afectan la supervivencia, actividad y producción de antibióticos de los inoculantes de control biológico (Weller ^{a,b}, 1988).

El problema parece ser el reduccionismo con el que se enfoca la búsqueda del control biológico, el pretender manejar todo un sistema de elevada complejidad, con base en solo una especie antagonica, aumentada masivamente e introducida directamente al suelo. Una aproximación para lograr el aumento en la eficiencia del control biológico contra fitopatógenos ha sido el empleo de antagonistas en consorcios (Dandurand y Knudsen, 1993; Janisiewicz, 1996; García, 2007), los que pueden lograr mayor efectividad en suprimir la enfermedad que la aplicación de antagonistas individuales (Jacobsen *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta la fecha los trabajos empleando antagonistas en consorcios no han sido realizados en campo.

De acuerdo con la situación actual del control biológico en las ciencias agrícolas y con el cambio de paradigma propuesto, la definición adoptada en el presente trabajo es la de Baker y Cook (1974). Esta definición tiene un enfoque holístico, ya que incluye un sin fin de métodos alternativos al control químico que pueden emplearse solos o en combinación.

Por ejemplo, variedades resistentes, fechas de siembra, solarización, acolchado del suelo mediante plásticos degradables, rotación y asociación de cultivos, incorporación al suelo de residuos de plantas y materia orgánica, aplicación de antagonistas, etc. (Zavaleta-Mejía, 1999). Estas prácticas disminuyen la incidencia de la enfermedad o su impacto en la producción de cultivos y reducen el empleo de los pesticidas protegiendo al ambiente.

4.8 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

La densidad poblacional de bacterias puede alcanzar más del 15% de la superficie de la rizósfera y estar cubierta por microcolonias de varias cepas bacterianas utilizando los alimentos que les proporciona el hospedero para su crecimiento, también secretan los metabolitos en la rizósfera; varios de estos metabolitos pueden actuar como compuestos señalizadores que son percibidos por células vecinas dentro de la misma microcolonia, por las células de otras bacterias que están presentes en la rizósfera, o por las células de raíz de la planta huésped (Van Loon y Bakker 2003; Bais *et al.*, 2004; Gray y Smith 2005; Kiely *et al.*, 2006).

El término de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocido por sus siglas en inglés PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), fue propuesto para describir a las bacterias que habitan la rizósfera de las plantas y que pueden tener un efecto positivo sobre los cultivos (Kloepper y Schroth, 1978). Las PGPR participan en muchos procesos importantes del ecosistema, tales como el control biológico de patógenos de las plantas, ciclos de nutrición y/o desarrollo de plántulas (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2004).

Pseudomonas y *Bacillus* son los géneros más comúnmente descritos como PGPR, pero otro gran número de géneros bacterianos están considerados dentro de esta clasificación: *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter* y *Azotobacter*, entre otros (Kloepper *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2004). Cepas selectas de PGPR han sido usadas como inoculantes de semillas (Dobbelaere *et al.*, 2001; Vessey, 2003; Lucy *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2004). Algunos de

estos inoculantes se basan en bacterias genéticamente modificadas y han sido evaluadas ecológicamente (Morrissey *et al.*, 2002), de acuerdo con la reglamentación dictada por la Unión Europea (Nutti, 1994).

Bashan y Holguín (1998), propusieron una nueva clasificación para las PGPR, que incluye a todas las bacterias benéficas teniendo en cuenta su papel particular, de tal forma, que el término se divide en PGPB (“plant growth promoting bacteria” - bacterias promotoras del crecimiento de las plantas) aplicable a las bacterias que influyen directamente sobre el metabolismo de las plantas promoviendo el aumento de la toma de agua y nutrientes, el desarrollo del sistema radical y la estimulación del funcionamiento de otros microorganismos benéficos presentes en la rizósfera.

El termino biocontrol-PGPB (“biocontrol-plant growth promoting bacteria” - bacterias promotoras del crecimiento de las plantas con actividad de control biológico) es utilizado para describir a las bacterias que adicionalmente tienen la capacidad de suprimir la actividad de los fitopatógenos por antagonismo microbiano o por la inducción de resistencia sistémica natural en la planta (Van Peer *et al.*, 1991; Van Loon *et al.*, 1998; 2003 y 2005).

Muchas bacterias en el suelo tienen propiedades similares (Compant *et al.*, 2005; Haas y Défago, 2005), pero en algunos casos las rizobacterias puede incrementar el crecimiento vegetal en la ausencia de microorganismos potencialmente patógenos, como ha sido comprobado en diversos sistemas gnobióticos (Van Loon y Bakker, 2003). Sin embargo, en algunos casos cepas de una misma especie podrían ser clasificadas como biocontrol-PGPB o PGPB. Es importante señalar que esta

clasificación permite incluir a otras bacterias benéficas que no son rizobacterias, entre las cuales destacan los rizobios, bacterias que tienen relación simbiótica con las plantas leguminosas (Glick *et al.*, 1999) y los microorganismos endófitos (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Recientemente se han reportado nuevas técnicas para la identificación y caracterización de PGPR, que permiten estudiar el patrón de la colonización y los determinantes moleculares de la colonización de la raíz (Lugtenberg *et al.*, 1991; Rothballer *et al.*, 2003; Espinosa-Urgel, 2004; Gamalero *et al.*, 2004).

4.8.1 Principales mecanismos de acción de rizobacterias

Las rizobacterias ofrecen una alternativa ecológica para controlar el ataque de patógenos y/o mejorar el rendimiento de los cultivos, por lo que actualmente se utilizan las técnicas de avanzada para entender sus mecanismos de acción (Elbeltagy *et al.*, 2001; James *et al.*, 2002; Vessey, 2003).

Pueden promover el crecimiento por vías directas o indirectas, cuyos elementos específicos no han sido debidamente caracterizados. Los efectos directos pueden evidenciarse en ausencia de otros microorganismos, es decir, la planta sólo interactúa con el microorganismo en estudio, mientras que los mecanismos indirectos se pueden observar en la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno, mediante la cual se reducen los efectos dañinos en el vegetal (Thrane *et al.*, 2000; Díaz-Vargas *et al.*, 2001).

La estimulación directa puede incluir y proveer a las plantas con la fijación de nitrógeno atmosférico (Malik *et al.*, 1997), de hierro que ha sido secuestrado por sideroforos bacterianos, fosfatos soluble y otros nutrientes (Torres-Rubio *et al.*, 2000). Además le brinda la capacidad de producir las cantidades correctas de las hormonas vegetales tales como AIA, ácido giberélico y citoquininas (Bloemberg y Lugtenberg, 2001), así como la capacidad de controlar los niveles de la hormona del etileno de la planta mediante 1-aminociclopropano-1 ácido carboxílico (ACC) con actividad diaminasa (Glick, 2005).

Entre los mecanismos de control biológico ampliamente reconocidos mediados por rizobacterias se encuentran la producción de bacteriocinas (Cherif *et al.*, 2003b), autolisinas (Raddadi *et al.*, 2004, 2005), lactonasas (Dong *et al.*, 2002), sideroforos (Bais *et al.*, 2004), β -1,3-glucanasas, quitinasas, cianida hidrogenada y por la habilidad de degradar ácido indol-3-acético (Leveau y Lindow, 2005), y la inducción de resistencia sistémica en la planta (Matiru y Dakora, 2004). Su inducción ha mostrado que comparte ciertas características (Tabla I), así como antibióticos producidos por los microorganismos que han mostrado ser particularmente efectivos al suprimir patógenos de plantas y las enfermedades que ocasionan (Pal *et al.*, 2006).

Algunos ejemplos de antibióticos reportados relacionados en la supresión de fitopatógenos se mencionan en la Tabla II. En todos los casos, los antibióticos han demostrado ser particularmente eficaces en la supresión del crecimiento del patógeno blanco bajo condiciones *in vitro* e *in situ*.

TABLA I

Determinantes bacterianos y tipos de resistencia inducida en el hospedero por agentes de control biológico.

Cepa Bacteriana	Especie de Planta	Determinante bacterial	Tipo	Referencia
<i>Bacillus mycoides</i> cepa Bac J	Betabel	Peroxidasa, quitinasa y β -1,3-glucanasa	RSI	Bargabus <i>et al.</i> , 2002.
<i>Bacillus pumilus</i> 203-6	Betabel	Peroxidasa, quitinasa y β -1,3-glucanasa	RSI	Bargabus <i>et al.</i> , 2004.
<i>Bacillus subtilis</i> GB03 y IN937a	<i>Arabidopsis</i>	2,3-butadienol	RSI	Ryu <i>et al.</i> , 2004.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>				
CHA0	Tabaco	Sideróforo	SAR	Maurhofer <i>et al.</i> , 1994.
	<i>Arabidopsis</i>	Antibióticos (DAPG)	RSI	Iavicoli <i>et al.</i> , 2003.
WCS374	Rábano	Lipopolisacárido	RSI	Leeman <i>et al.</i> , 1995.
		Siderofofo		Leeman <i>et al.</i> , 1995.
		Factor regulado por fierro		Leeman <i>et al.</i> , 1995.
WCS417	Clavel	Lipopolisacárido	RSI	Van Peer and Schipper, 1992.
	Rábano	Lipopolisacárido	RSI	Leeman <i>et al.</i> , 1995.
		Lipopolisacárido		Leeman <i>et al.</i> , 1995.
	<i>Arabidopsis</i>	Lipopolisacárido	RSI	Van Wees <i>et al.</i> , 1997.
	Tomate	Lipopolisacárido	RSI	Duijff <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pseudomonas putida</i> s	<i>Arabidopsis</i>	Lipopolisacárido	RSI	Meziane <i>et al.</i> , 2005.
WCS 358	<i>Arabidopsis</i>	Lipopolisacárido	RSI	Meziane <i>et al.</i> , 2005.
		Sideróforo	RSI	Meziane <i>et al.</i> , 2005.
BTP1	Frijol	Z,3-hexenal	RSI	Ongena <i>et al.</i> , 2004.
<i>Serratia marcescens</i> 90-166	Pepino	Sideróforos	RSI	Press <i>et al.</i> , 2001.

Tabla II
Algunos antibióticos producidos por bacterias.

Antibiótico	Fuente	Patógeno blanco	Enfermedad	Referencia
2,4-diacetyl-phloroglucinol	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	<i>Pythium</i> spp.	Damping off	Shanahan <i>et al.</i> , 1992.
Agrocin 84	<i>Agrobacterium Radiobacter</i>	<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	Agalla de la corona	Kerr, 1980.
Bacilomicina D	<i>Bacillus subtilis</i> AU195	<i>Aspergillus flavus</i>	Contaminación por Aflatoxinas	Moyne <i>et al.</i> , 2001.
Bacilomicina, fungimicina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>F. oxysporum</i>	Marchitez	Koumoutsis <i>et al.</i> , 2004.
Xantobacina A	<i>Lysobacter</i> sp. cepa SB-K88	<i>Aphanomyces Cochlioides</i>	Damping off	Islam <i>et al.</i> , 2005.
Gliotoxina	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición de la Raíz	Wilhite <i>et al.</i> , 2001.
Herbicolina	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1	<i>Erwinia amylovora</i>	Tizon de fuego	Sandra <i>et al.</i> , 2001.
Iturina A	<i>B.subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> y <i>R. solani</i>	Damping off	Paulitz y Belanger, 2001; Kloepper <i>et al.</i> , 2004.
Micosubtilina	<i>B. subtilis</i> BBG100	<i>Pythium Aphanidermatum</i>	Damping off	Leclere <i>et al.</i> , 2005.
Fenanazina	<i>P. fluorescens</i> 2-79 y 30-84	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Take-all	Thomashow <i>et al.</i> , 1990.
Pioluteorina Pirrolnitrina	<i>P. fluorescens</i> Pf-5	<i>Pythium ultimum</i> y <i>R. solani</i>	Damping off	Howell <i>et al.</i> , 1980.
Pirrolnitrina	<i>Burkholderia Cepacia</i>	<i>R. solani</i> y <i>Pyricularia oryzae</i>	Damping off y ráfaga del arroz	Homma <i>et al.</i> , 1989.
Zwittermicina A	<i>Bacillus cereus</i> UW85	<i>Phytophthora medicaginis</i> y <i>P. aphanidermatum</i>	Damping off	Smith <i>et al.</i> , 1993.

4.9 *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico de fitopatógenos

El uso de especies de *Bacillus* Gram positivas como agentes del control biológico es relativamente raro y ha recibido un estudio menos intensivo que el uso de bacterias Gram negativas. Los antagonistas estudiados han sido principalmente *Bacillus subtilis* y ocasionalmente *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. polymyxa* (Utkhede, 1984; Silo-Shu *et al.*, 1994).

Las especies de *Bacillus* tienen la característica de estar extensamente distribuidas en diferentes tipos de suelos, teniendo alta tolerancia al calor, mostrando un rápido crecimiento en cultivos líquidos y fácilmente forman esporas resistentes. Por otra parte, se consideran agentes con un gran potencial biológico. Sin embargo, la evaluación de bacterias se ha centrado principalmente en la supresión de la enfermedad (Siala y Gray, 1974; Acea *et al.*, 1988; Silo-suh *et al.*, 1994), pero la dinámica de la población y los mecanismos de supresión en suelo de patógenos vegetales por *Bacillus* spp. no se han investigado extensivamente.

El bacilo entomopatogénico *Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva formadora de esporas que pertenece al grupo de *Bacillus cereus* que abarca seis especies descritas y validadas (Daffonchio *et al.*, 2000; Cherif *et al.*, 2003a). Esta bacteria es ubicua y extensamente difundida en el medio ambiente incluyendo suelo; insectos y otros hábitats; productos almacenados y almacenes; materiales vegetales y ambientes acuáticos (Glare y O'Callaghan, 2000; Hernández *et al.*, 2005; Bizzarri y Bishop, 2007).

Ha sido extensamente usado como bioinsecticida para el control de muchos insectos plaga en la agricultura y vectores de enfermedades en humanos y constituyen la base de más del 90% de los biopesticidas comercialmente disponibles (Chattopadhyay *et al.*, 2004). Esto debido a su capacidad de producir las toxinas cristalinas protéicas características (δ -endotoxins) con una actividad específica contra ciertas especies de insectos (Schnepf *et al.*, 1998).

Los genes *cry* son expresados en muchas plantas permitiendo su protección contra insectos patógenos y plantas genéticamente modificadas (PGM) de acuerdo con genes de la toxina de *B. thuringiensis* representa cerca de 19% del área cultivada transgénica total en el mundo (James, 2005).

4.9.1 Actividad antifúngica de *B.thuringiensis*

4.9.1.1 Quitinasas y β -1, 3-glucanasas

La pared celular fúngica representa el 20-30% del peso seco de células fúngicas, protege a la célula contra daño físico y es responsable de su forma. La pared celular fúngica con su cubierta esquelética está integrada por quitina y β -1,3-glucanasa, es un blanco para una amplia gama de proteínas anti hongos, estos incluyen esencialmente quitinasas y glucanasas las cuales degradan la quitina y glucanos que llevan respectivamente a la lisis de la célula del hongo (Theis y Stahl, 2004).

Las quitinasas se encuentran en una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, hongos y plantas más evolucionadas, desempeñando diversos papeles en su origen (Felse y Panda, 1999). En 1992, Sabry aisló 40 cepas de bacterias y se probó

la degradación de la quitina mediante la producción de quitinasa, los organismos más activos fueron identificados como *Alcaligenes denitrificans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megetarianum* y *B. subtilis*. En el mismo año, Slabospitskaia y Krymovskaia, (1986) analizaron las actividades quitinolítica de 171 cepas de 15 especies de bacterias aerobias formadoras de esporas, aisladas de diferentes superficies ecológicas. Se estudiaron 85 cepas de *Bacillus* y el 50% hidrolizó quitina coloidal, entre los cultivos aislados de humanos y animales; el 60% de las cepas se caracterizaron por la presencia de quitina extracelular, y de un 37% de las cepas de colección y un 40 a 43% en los aislados del suelo y de insectos respectivamente.

Takayanagi *et al.*, (1991), aislaron cuatro quitinasas termoestables de caldos de cultivos libres de células de *B. licheniformis* X-7u. De igual manera Watanabe (1990), aisló *B. circulans* WL-12, bacteria lítica de la pared celular de una levadura, mediante la secreción de enzimas, la quitinasa de la bacteria fué inducida con quitina y se lograron detectar seis moléculas distintas de quitinasas.

Por otra parte Takegawa *et al.*, (1991), establecieron que existe similitud entre la endo-beta-N-acetilglucosaminidasa de *Flavobacterium* y las quitinasas de *B. circulans*, *serratia marcescens*. Así mismo Blaak *et al.*, 1993, establecieron que *Streptomyces olivaceoviridis* degrada eficientemente la quitina. Tsujibo *et al.*, (1992), también han aislado quitinasas de bacterias marinas, *Alteromonas* spp., que muestran una secuencia homóloga con quitinasas de bacterias terrestres como *Serratia marcescens* QMB 1466 y *Bacillus circulans* WL-12. Un año más tarde, en 1993, este mismo investigador purificó quitinasa de *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520, esta enzima posee similitud con las cepas QMB-1566 y WL-12.

Los microorganismos productores de quitinasas han sido reportados como agentes de control biológico para diferentes clases de enfermedades fúngicas de plantas (Chernin *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2004). En el grupo de *B. cereus*, se encontraron cepas productoras de quitinasas efectivas en el control biológico de hongos fitopatógenos. En adición, la cepa 65 de *B. cereus* endofítica produjo una quitobiosidasa que fue efectiva contra *Ralstonia solani* en algodón (Pleban *et al.*, 1997).

Recientemente, se ha reportado (Huang y Chen, 2004; Huang *et al.*, 2005) que la cepa *B. cereus* 28-9 exhibió potencial de control biológico en el hongo patógeno *Botrytis elliptica* el agente causal de la marchitez de la hoja de lirio, la enfermedad más severa y destructiva de los lirios cultivados en campo. Aunque las quitinasas sean producidas por diferentes serovares de *B. thuringiensis* (Liu *et al.*, 2002), hay algunos informes sobre el potencial fungicida de control biológico por estas enzimas.

Reyes-Ramírez *et al.*, (2004), reportan que la quitinasa producida por *B. thuringiensis* cepa *israelensis* mostró inhibición fúngica entre 45 y 100% cuando se probaron en cultivo de crecimiento, la adición de esta quitinasa a semillas de soya infectadas con *Sclerotium rolfsii* incrementaron la germinación de 25 a 90%. Así, además de su papel importante como factores sinérgicos para el realce del potencial insecticida de *B. thuringiensis*, quitinasas de *B. thuringiensis* son promisorias en el control biológico de hongos fitopatógenos y para la preservación de semillas almacenadas.

Con respecto a las glucanasas, varios estudios reportan la producción de éstas enzimas por diferentes especies en el género *Bacillus* como es *B. subtilis* (Tang *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006), *B. circulans* (Kim, 2003), *B. clausii* (Miyaniishi *et al.*, 2003) y *B. amyloliquefaciens* (Il Kim y Chung, 2004). Hasta ahora, no hay reportes en la literatura sobre investigaciones de esta actividad en el grupo de *B. cereus* y especialmente en *B. thuringiensis*.

4.9.1.2 Zwitermicina A

El antibiótico zwitermicina A (ZwA), fue primeramente identificado por la habilidad de *B. cereus* UW85 a suprimir el damping-off de la alfalfa (Silo-Suh *et al.*, 1994) y su probable importancia para otras actividades biológicas de UW85, como el control de la putrefacción del fruto del pepino (Smith *et al.*, 1993) o la supresión de otras enfermedades de plantas en el laboratorio y en el campo (Handelsman *et al.*, 1991; Osburn *et al.*, 1995).

En otro estudio, ZwA demostró tener un rango de inhibición en diversos protistas, oomycetes, hongos y bacterias (Silo-Suh *et al.*, 1998). La actividad inhibitoria de ZwA contra oomycetes puede ser de gran interés para el control de hongos fitopatógenos filamentosos (Shang *et al.*, 1999), en donde las quitinasas pueden no tener actividad puesto que carecen de quitina en sus membranas celulares (Theis y Stahl., 2004).

El modo de acción de ZwA no se entiende todavía, sin embargo se ha sugerido una asociación entre los efectos en potencial de la membrana, la actividad RNA polimerasa, y la sensibilidad a ZwA (Stabb y Handelsman, 1999). Se ha demostrado

que el antibiótico ZWA también ser producido por *Bacillus thuringiensis* (Raffel *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2004).

Estudios recientes demuestran que el cluster 38.6 kb de biosíntesis de ZWA *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* cepa YBT-1520 tiene una organización similar a la de *B. cereus* UW85 (Zhao *et al.*, 2007). Basados en la información estructural y genética, se puede pensar que el ZWA prematuro es sintetizado por una sintetasa péptida no ribosomal y una ruta híbrida de sintetasa poliketida (SPK), después una carbamyl transferasa cataliza el ZWA prematuro en ZWA. (Ansari *et al.*, 2004; Emmert *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007).

4.9.1.3 Cianida hidrogenada

La cianida hidrogenada es un metabolito secundario producido típicamente de la glicina por hongos, y bacterias durante la fase temprana de crecimiento estacionario (Faramarzi *et al.*, 2004). Este metabolito ha sido largamente estudiado en la contribución de la patogenicidad bacteriana (Gallagher y Manoil, 2001; Firoved y Diretic, 2003) y es considerado como un compuesto de amplio espectro antimicrobial implicado en el control biológico de enfermedades radicales de asociaciones entre plantas y *Pseudomonas fluorescens* (Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998; Blumer y Haas, 2000; Ramette *et al.*, 2003).

Recientemente, bacterias del genero *Bacillus* mostraron tener *in vitro* una producción en cantidad relevante de cianida hidrogenada, lo cual es muy interesante puesto que *Bacillus* representa una parte muy importante en porcentaje por encima

del 50% de la comunidad microbiana del suelo. Debido a lo anterior, se piensa que CNH+*Bacillus* pueden estar implicados en la patogenicidad (Benizri *et al.*, 2005).

Hasta hoy, no hay reportes en la literatura de la relación entre la producción de CNH por *Bacillus* y su correspondiente actividad de control biológico. Sin embargo, investigaciones preliminares sobre la producción *in vitro* de CNH, en siete cepas de 16 aislamientos de *B. thuringiensis* mostraron desarrollo del color café característico usando papel indicador de Lorck- CNH (1948), la mayor parte de las cepas productoras de CNH fueron positivas a Zwittermicina A con respuestas antagónicas *in vitro* que podrían ser explicadas por la sinergia entre la CNH y el antibiótico (Raddadi *et al.*, unpublished data).

En otro estudio se probó el efecto antagonista de 89 aislamientos de *Bacillus* sp. colectados de la rizosfera de algodón sobre *Verticillium dahliae* Klebahn, de los cuales tres aislamientos bacterianos inhibieron el crecimiento micelial del hongo con la producción de metabolitos volátiles y la producción de cianida hidrogenada *in vitro*. Mientras que en ensayos de invernadero, uno de los tres aislamientos de *Bacillus* sp. incrementó la longitud de la raíz del algodón en suelo infestado con el hongo (Tehrani *et al.*, 2001).

5. MÉTODOS

5.1 Localización del experimento

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Suelo del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del estado de Durango.

5.2 Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

Para la realización de estudios etiológicos y epidemiológicos se llevaron a cabo recorridos de campo en parcelas donde se cultivaron distintos tipos de chile en la zona productora de Durango, durante los cuales se colectaron plantas con síntomas típicos de marchitez y fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento (Figura 1).

Las raíces fueron lavadas con agua corriente y secadas sobre papel estroza, para luego ser cortadas en trozos pequeños de 8 a 10 mm de tejido sano y enfermo, se desinfectaron externamente utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% durante cinco minutos. Después de este tratamiento, fueron lavados minuciosamente con agua destilada estéril y se les retiró el exceso de humedad en la campana de flujo laminar. Los trozos desinfectados fueron colocados en cajas Petri conteniendo

papa dextrosa agar (PDA), posteriormente se incubaron a 25°C por 48 h, procediendo a purificar los aislados por la técnica de punta de hifa y una vez que se desarrollaron se identificaron por comparación con claves taxonómicas como las proporcionadas por Barnett y Hunter, 1998; Erwin y Ribeiro, 1996 y Sneh y Ogoshi, 1991, posteriormente se almaceno una réplica en aceite mineral y otra en PDA a 5°C durante el tiempo que duró el experimento (Figura 2).



Figura 1. Colecta de plantas con síntomas típicos de marchitez, de distintos tipos de chile en la zona productora del estado de Durango.



Figura 2. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos. A) y B), Lavado y secado de raíces; C), Cortes de tejido sano y enfermo; D), Desinfección con hipoclorito de Sodio y lavado con agua destilada estéril; E), Retiro de humedad en campana de flujo laminar; F), Siembra en cajas Petri (PDA); G) y H), Aislamiento y purificación; I, J, K) y L), Almacenamiento en aceite mineral.

5.3 Pruebas de calidad de la semilla de chile

5.3.1 Selección de la muestra

El muestreo de la semilla es la primera actividad crítica en un programa de prueba confiable de la calidad y sanidad de la semilla. Inicialmente, fue determinada la pureza física de 16 de lotes de semilla de *Capsicum annuum* L. cosechadas en el ciclo agrícola primavera-verano 2006 en la zona productora de chile del estado de Durango. De esa forma, siguiendo como las reglas para análisis de semillas (Brasil, 1992), las semillas de cada lote fueron separadas en dos componentes, semillas puras y material inerte.

Posteriormente, se realizó una limpieza adicional de cada lote de semillas (examen visual y separación manual de otros materiales) para asegurar la obtención de pureza física superior al 98%. Durante el período del experimento las muestras de trabajo se mantuvieron en bolsas de polietileno, en refrigeración a una temperatura de $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ para evitar el deterioro de la semilla (Figura 3).

5.3.2 Germinación estándar

Para determinar la capacidad de germinación se realizó la prueba estándar de acuerdo a lo recomendado por ISTA (1985). Para ello, de cada uno de los lotes se utilizaron tres repeticiones de 100 semillas previamente desinfectadas con fungicida, las que se sembraron entre toallas de papel secante húmedo (Anchor) que se enrollaron en forma de taco sujetos con ligas en los extremos y dentro de bolsas de polietileno para evitar la evaporación, se colocaron en una cámara de germinación de

alta capacidad a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 16 luz/8 oscuridad de fotoperiodo, manteniendo las mismas condiciones de humedad y temperatura durante todo el periodo de la prueba.

Al séptimo día se realizó un primer conteo, en el cual se anotaron las plántulas normales eliminándolas de la prueba, al día catorce se realizó el conteo final de germinación donde se anotaron plántulas normales, anormales y semillas sin germinar (Figura 4).

El porcentaje de germinación se obtuvo del promedio de las repeticiones para plántulas normales. La prueba se llevó a cabo 3 veces dentro del mismo laboratorio para evaluar la repetitividad de resultados.



Figura 3. Acondicionamiento de semillas de Chile. A), Muestras de semilla; B), Semilla puras y material Inerte; C), Registro y etiquetado; D), Almacenamiento de semilla.

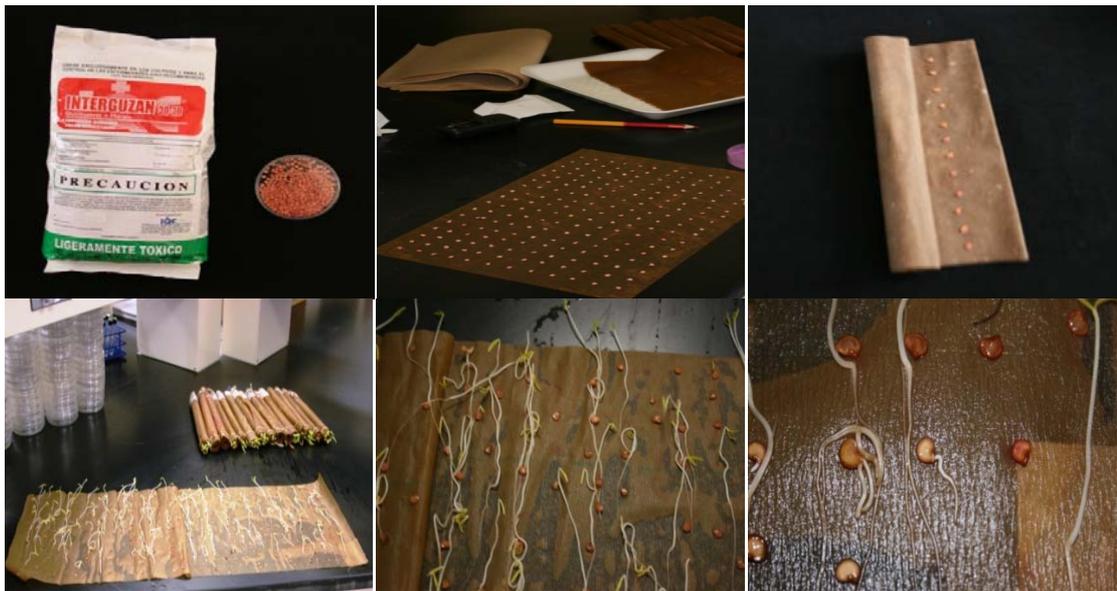


Figura 4. Prueba de germinación estándar. A), Tratamiento a la semilla con fungicida; B), Siembra de semilla en papel húmedo; C), Enrollado en forma de taco; D) y E), Plántulas primer conteo; F), Plántulas segundo conteo.

5.3.3 Germinación en charola “Bandeja speedling”

Para esta prueba (Figura 5), la siembra se realizó en charolas plásticas de 200 alvéolos usando como sustrato una mezcla de turba 80% v/v (Peat moss ProMix) y perlita 20% v/v (Harbolite).

Las charolas fueron llenadas con el sustrato cuidando que este no sobrepasara el borde del alveolo. Posteriormente se procedió a depositar las semillas (una por alveolo) procurando mantener una uniformidad en la profundidad de siembra. Para esta prueba se utilizaron 4 repeticiones de 100 semillas por lote. Cada lote de semillas se sembró en dos charolas y se incubaron a temperatura de laboratorio. Se contabilizaron las plántulas emergidas en cada charola a los 7 y 14 días después de la siembra.



Figura 5. Germinación en charola “Bandeja speedling”. A), Preparación del sustrato; B), Llenado de charolas; C), Siembra de semilla; D), Tapado de semilla; E), Primer conteo; F), Segundo conteo.

5.3.4 Envejecimiento acelerado

Esta prueba se efectuó de acuerdo a la metodología propuesta por AOSA (1983), donde la semilla se sometió a una temperatura de 42°C y una humedad relativa mayor de 90 por ciento, condiciones que se mantuvieron en una cámara de envejecimiento.

Como cámara interna se utilizaron vasos de precipitado graduados de 250 ml a los que se les agregó 50 ml de agua destilada, con una malla metálica dentro y una base de igual material como soporte donde se colocaron 100 semillas por cada lote distribuidas uniformemente. Después se taparon los vasos con papel aluminio delgado doblado en cuatro partes y se sellaron con ligas. Estos se colocaron en la cámara de envejecimiento a $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24 h, y una vez terminado el tiempo se

realizó la prueba de germinación estándar bajo la metodología descrita anteriormente, realizándose solo un conteo al final de la prueba a los 14 días. En este se anotaron las plántulas normales, las que se reportaron como porcentaje de germinación después del envejecimiento y se anotaron las plántulas anormales y las semillas muertas (Figura 6).

La prueba se repitió 3 veces dentro del laboratorio para evaluar la repetitividad de los resultados.

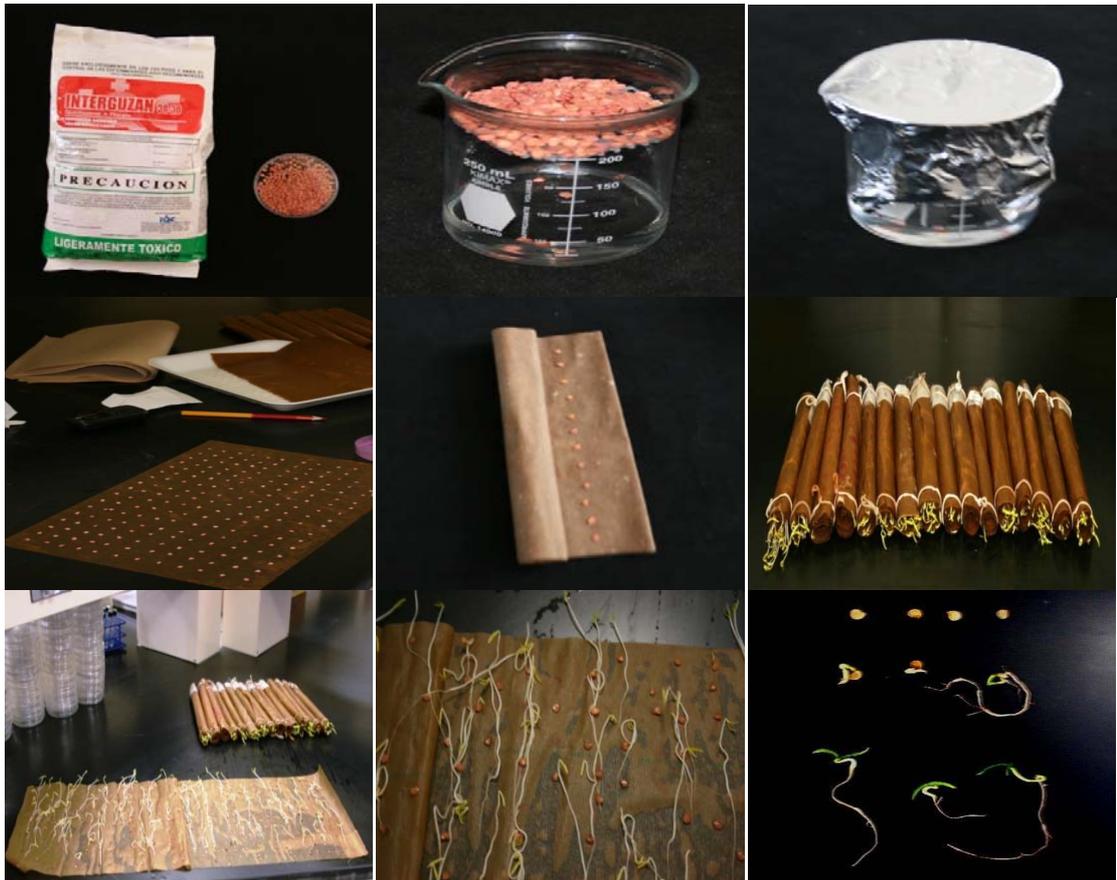


Figura 6. Prueba de envejecimiento acelerado. A), Tratamiento a la semilla con fungicida; B) y C), Cámara interna; D), Siembra de semilla en papel húmedo; E), Enrollamiento en forma de taco; F), G) y H) Plántulas primer conteo; I), Plántulas segundo conteo.

5.3.5 Pruebas de sanidad y germinación de semilla *in vitro*

Se utilizaron 100 semillas por muestra y fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y una vez con alcohol al 70% durante 1 minuto. Se colocaron sobre papel estroza esterilizado para su secado en la cámara de flujo laminar. Las semillas desinfectadas se colocaron en grupos de 10 en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA (Massago *et al.*, 1977; Tsao y Guy, 1977) y se sellaron con parafilm, las cuales fueron dispuestas en una cámara de incubación a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16 h luz/8 h oscuridad de fotoperiodo.

La sanidad de la semilla se determinó conjuntamente con la prueba de germinación *in vitro* (Figura 7), evaluando inicialmente a los siete días y terminando a los 15 días después de la siembra, enumerando las colonias de hongos que crecieron en la semilla e identificándolos con base en base la observación de caracteres macro-microscópicos y el uso de claves apropiadas (Nelson *et al.*, 1983; Pitt y Hocking, 1985; Barnett y Hunter, 1998).

Se cuantificó el número de géneros fúngicos desarrollados y el porcentaje de germinación de las semillas. El criterio para evaluar la efectividad de los métodos de análisis sanitarios se basó en el número de géneros fúngicos desarrollados a partir de las semillas presentes por cada unidad experimental, en este caso por cada caja Petri.

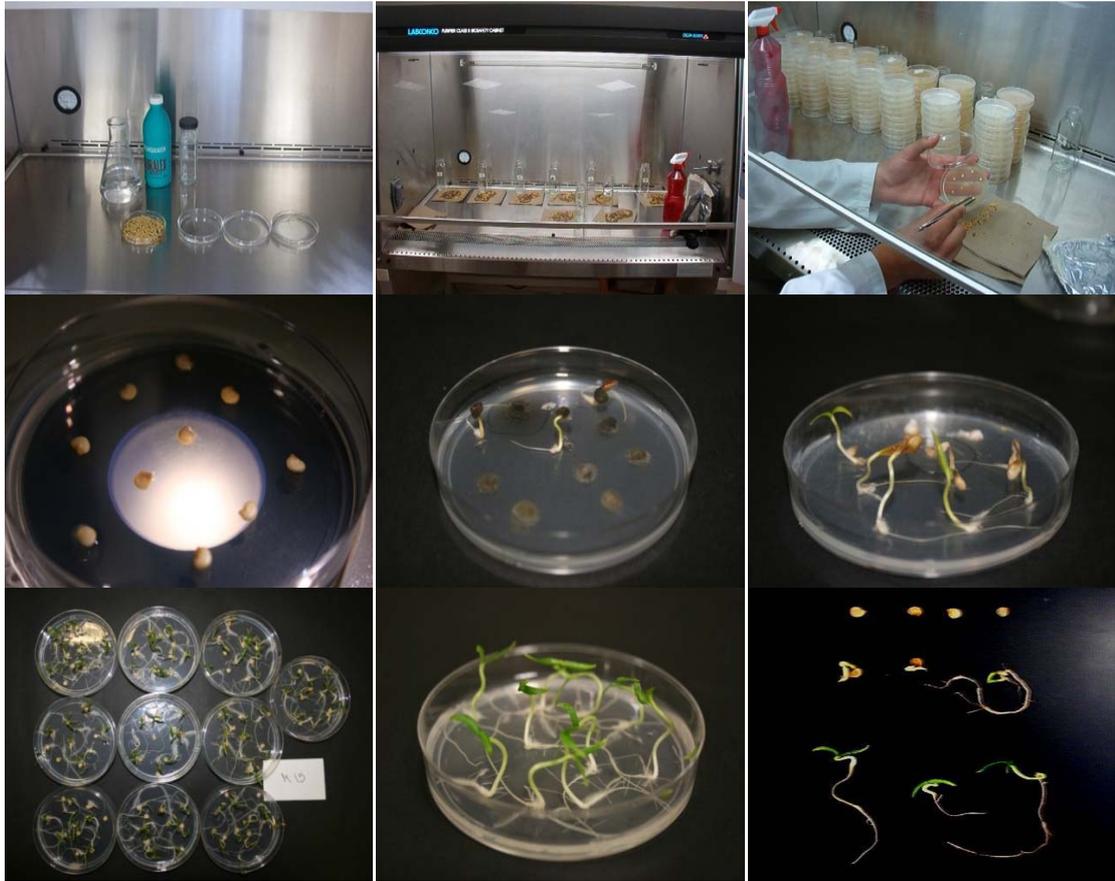


Figura 7. Pruebas de sanidad y germinación de semilla de chile. A), Desinfección con hipoclorito de Sodio y lavado con agua destilada estéril; B), Retiro de humedad en campana de flujo laminar; C), Siembra en cajas Petri (PDA); D), E) y F), Cuantificación de hongo; G) y H), Germinación 7 y 14 días; I), Plántula normal, anormal y sin germinar.

De acuerdo con los objetivos de la presente investigación los resultados obtenidos son expuestos y discutidos en un análisis individual para cada una de las pruebas de calidad para cada lote y considerando la variabilidad en calidad de ellos, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey, usándose en todos los casos un nivel de significancia de $P(\leq 0.05)$. Para todos los análisis, se usó la versión 6.12 del programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

5.4 Antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* contra *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*

5.4.1 Selección de cepas de *B. thuringiensis*

Las 64 cepas GM y HD de *B. thuringiensis* que se probaron como agentes antagonistas se obtuvieron de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatógenos de la FCB-UANL (Tabla III y Tabla IV). Estas permanecieron liofilizadas hasta que se activaron para su uso en tubos de ensayo conteniendo 2.5 ml de caldo nutritivo a pH 7, los que se incubaron a una temperatura de 30°C durante 24 h en agitación rotatoria a 150 rpm, para luego ser resembradas en agar nutritivo inclinado a pH 7 y mantenidas en incubación a 28°C durante 48 h.

Tabla III

Cepas GM de *B. thuringiensis* usadas en los ensayos de antagonismo

GM-5	GM-13	GM-26	GM-39	GM-55	GM-88	GM-109
GM-6	GM-18	GM-27	GM-46	GM-63	GM-84	GM-115
GM-7	GM-20	GM-28	GM-51	GM-64	GM-92	GM-116
GM-8	GM-23	GM-29	GM-52	GM-66	GM-93	GM-138
GM-11	GM-24	GM-33	GM-54	GM-69	GM-104	GM-162
GM-235	GM-615					

Tabla IV

Cepas HD de *B. thuringiensis* usadas en los ensayos de antagonismo

HD-1	HD-116	HD-187	HD-244	HD-531	HD-577	HD-652
HD-14	HD-121	HD-193	HD-333	HD-559	HD-597	HD-972
HD-24	HD-133	HD-203	HD-501	HD-569	HD-615	HD-974
HD-57	HD-184	HD-263	HD-530	HD-571	HD-650	

5.4.2 Aislamiento de los hongos fitopatógenos

Los organismos en estudio fueron seleccionados de una colección de fitopatógenos nativos de la zona productora de chile del estado de Durango, resultado de estudios preliminares de esta investigación, con los que se realizaron resiembras para su activación en PDA para *R. solani* y *F. oxysporum*, para *P. capsici* se utilizó Agar V-8 (Figura 8).

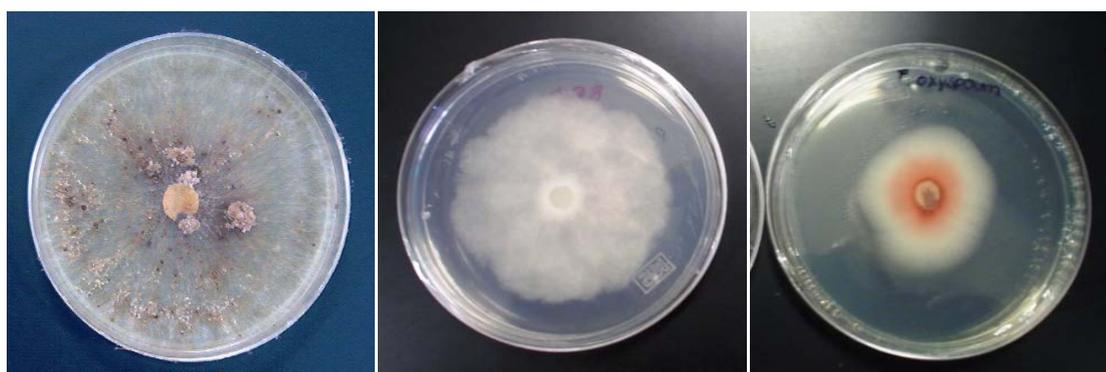


Figura 8. Cepas de hongos fitopatógenos. A), *R. solani*; B), *P. capsici*; C), *F. oxysporum*.

5.4.3 Determinación de antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* contra *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*

Para seleccionar cepas de *B. thuringiensis* con potencial antagónico, se llevó a cabo un ensayo preliminar en cajas Petri conteniendo papa dextrosa agar (Figura 9), en donde se colocaron las 64 cepas de *B. thuringiensis* en grupos de cuatro a seis, con cada uno de los tres hongos individualmente, al término de 8 días de incubación bajo condiciones de laboratorio, se descartaron las cepas de *B. thuringiensis* que no presentaron halos de inhibición.



Figura 9. Selección de cepas antagonistas de *B. thuringiensis*. A), *Bt.* contra *R. solani*; B), *Bt.* contra *P. capsici*; C), *Bt.* contra *F. oxysporum*.

Para evaluar la capacidad de inhibición de crecimiento de *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* (Figura 10), un disco o plug de 10 mm de un cultivo puro fué colocado en el centro de una caja Petri con PDA, posteriormente se trazó un círculo de 6 cm de diámetro rodeando el inóculo fúngico con una suspensión bacteriana del antagonista conteniendo 5×10^9 ufc mL⁻¹.

Las cajas fueron incubadas durante 72 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y se evaluó el diámetro del crecimiento radial, tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición, comparándose

con el control en donde la suspensión bacteriana fue sustituida por agua destilada estéril. Los resultados se expresan como el porcentaje de las medias de inhibición correspondiente a cada una de las cepas bacterianas.

El porcentaje de inhibición fue calculado usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = (1 - (\text{crecimiento fúngico} / \text{crecimiento del control}) \times 100)$$



Figura 10. Inhibición de crecimiento *in vitro* de *B. thuringiensis* contra: A), *R. solani*; B), *P. capsici*; C), *F. oxysporum*.

5.4.4 Efecto de *B. thuringiensis* sobre la germinación de semillas de chile

Se emplearon semillas de chile de la variedad Anaheim, éstas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante cinco minutos, seguida de tres lavados de tres minutos en agua destilada estéril. Las semillas se sumergieron durante una hora en suspensiones individuales de cada una de las cepas de *B. thuringiensis* en agua sacarosa al 3%, conteniendo 1×10^8 ufc mL^{-1} y las semillas fueron sembradas en recipientes de plástico conteniendo 300 g de una mezcla estéril de suelo, peat-mos, vermiculita y perlita (1:1:1) previamente inoculados con los fitopatógenos e incubándose bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

En el caso del inoculo de *R. solani*, la suspensión se ajustó hasta alcanzar 10^{6-7} propágulos o fragmentos por ml, para *P. capsici* 10^{5-6} zoosporas por ml y para *F. oxisporum* 10^{6-7} conidios por ml. Se realizaron dos controles en donde las semillas se trataron solo con la solución estéril de agua destilada más sacarosa al 3% y sembradas con y sin inóculo del fitopatógeno. Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones y cada una implicó cuatro plantas. La eficacia de las cepas de *B. thuringiensis* fue calculada basándose en el porcentaje de germinación a los 20 días posteriores a la siembra (Figura 11).



Figura 11. Efecto de *B. thuringiensis* sobre la germinación de semillas de chile. A), B) y C), preparación de sustrato y llenado de charolas; D) y E), Inoculación de semillas; F), Incubación de charolas; G), H) y I), Germinación de semilla.

En cada experimento se utilizó un Diseño Completamente al Azar con Arreglo Factorial AxBxC considerando cada fitopatógeno por triplicado y repetido por lo menos tres veces. Se realizó a un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey, usándose en todos los casos un nivel de significancia de $P(\leq 0.05)$. Para todos los análisis, se usó la versión 6.12 del programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

5.5 Antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* contra *R. solani*

Para llevar a cabo este experimento se seleccionaron 6 de las cepas de *B. thuringiensis* que tuvieron el mejor efecto antagónico sobre *R. solani* en los experimentos anteriores (Figura 12).



Figura 12. Antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* contra *R. solani*.

5.5.1 Producción de antibióticos volátiles

La habilidad de las cepas bacterianas de producir antibióticos volátiles fue evaluada usando el procedimiento descrito por Montealegre *et al.*, (2003). En el centro de una placa con AN fueron colocados 100 μ l de la solución bacteriana

antagonista (5×10^9 ufc mL^{-1}) y en el centro de otra placa ahora con PDA fue colocado un disco de 5 mm de un cultivo *R. solani* de cuatro días de edad. Ambas placas fueron colocadas cara a cara previniendo cualquier contacto físico entre el fitopatógeno y la solución bacteriana sellando la unión para prevenir la pérdida de volátiles (Figura 13).

Las cajas fueron incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas, evaluando el crecimiento del fitopatógeno y comparándolo con el desarrollo de los testigos en ausencia del antagonista. Cada cepa bacteriana se probó por triplicado y el experimento fue repetido por lo menos tres veces. Los resultados se expresaron como medias del porcentaje de inhibición del crecimiento de *R. solani* en la presencia y ausencia de la cepa bacteriana.



Figura 13. Producción de antibióticos volátiles.

5.5.2 Filtrado de antibióticos

Colonias de bacterias fueron transferidas a matraces Erlenmeyer, conteniendo 100 ml de medio líquido a base de papa-dextrosa, e incubando en la oscuridad bajo agitación rotatoria a 150 rpm por siete días, tomando alícuotas de 5 ml de estos

medios, para centrifugarlas a 3,000 rpm durante 10 min y así obtener los sobrenadantes que a continuación se hicieron pasar por filtros milipore (Tipo GS de 0.22 μm), depositando posteriormente, 100 μl del filtrado, en cavidades realizadas con anterioridad mediante un sacabocados de 9 mm de diámetro en cajas Petri conteniendo PDA. Permitiendo la difusión de la sustancia activa durante 20 a 30 min, se colocó un disco de 5 ml de *R.solani* en el centro de las cajas petri, las cuales fueron incubadas a temperatura de laboratorio por 72 h al término se midió el crecimiento radial del patógeno (Figura 14).

En el control se reemplazó la suspensión bacteriana por medio líquido a base de papa-dextrosa.



Figura 14. Filtrado de antibióticos. A), Incubación en agitación de cepas de *B. thuringiensis*; B), Filtrado de sobrenadantes; C), Deposito de filtrados; D) y E), Colocación de discos de *R. solani*; F), Desarrollo de *R. solani*.

5.5.3 Termoestabilidad de antibióticos

Colonias de bacterias fueron transferidas a matraces Erlenmeyer, conteniendo 100 ml de medio líquido a base de papa dextrosa, e incubando en oscuridad bajo agitación rotatoria a 150 rpm durante siete días, muestras de 10 ml del caldo fermentado fueron transferidas a matraces Erlenmeyer conteniendo 90 ml de PDA, y posteriormente se esterilizaron en autoclave durante 20 min a una temperatura de 120°C, se homogenizó la suspensión y se depositaron 20 ml en cajas Petri. Una vez solidificado el medio se colocó un disco de 5 ml de *R. solani* en el centro de las cajas Petri, las cuales fueron incubadas durante 72 hrs a 25°C al término se midió el crecimiento del patógeno. En el control se reemplazó la suspensión bacteriana por medio líquido a base de papa-dextrosa.

5.5.4 Ensayo de plántulas *in vitro*

Para llevar a cabo el ensayo de plántulas *in vitro* (Figura 15), primeramente se procedió a sembrar el hongo *R. solani* en cajas Petri conteniendo Agar Malta, medio específico para el crecimiento e incremento de los esclerocios cuyas características son muy peculiares. Posteriormente las cajas fueron incubadas a 28°C por 30 días aproximadamente; pasado este tiempo los esclerocios fueron extraídos utilizando para ello una pinza estéril y depositados en cajas Petri 60 x 15, con un promedio de 50 esclerocios por caja.

La incorporación de los esclerocios al sustrato en vasos se realizó antes de sembrar las semillas, utilizándose cinco esclerocios que fueron previamente seleccionados; se incorporaron los esclerocios uniformemente a una profundidad de

2 cm de la semilla para que esta pudiera germinar antes de que entrara en contacto con el patógeno.

La superficie de las semillas de chile fue desinfectada durante cinco minutos usando una solución de hipoclorito de sodio al 2% y enjuagadas varias veces con agua destilada estéril, posteriormente inoculadas sumergiéndolas durante una hora en suspensiones individuales de cepas de *B. thuringiensis* a una concentración de 10^8 ufc mL⁻¹, las semillas seleccionadas en número de 4 fueron sembradas en cada vaso con una distribución homogénea y equidistante a una profundidad en relación a la superficie del vaso de 2 cm.

Se contó para ello con un testigo blanco que consistió de la siembra en vasos de las semillas sumergidas en agua destilada estéril y el segundo denominado testigo con *Rhizoctonia* que consistió en la aplicación de este fitopatógeno para luego sembrar las semillas de tomate, aquí no se empleó ninguna cepa bacteriana.

Una vez sembradas las semillas según cada tratamiento e incluyendo los testigos ya mencionados, los vasos fueron ubicados por 20 días en el laboratorio, cuya temperatura promedio fue de 25°C y regados diariamente con 10 ml de agua estéril por cada vaso.

La severidad de la enfermedad se evaluó usando una escala patogénica de 0 a 5 en donde: 0=sin síntomas visibles de enfermedad; 1=hojas ligeramente marchitas con lesiones parduzcas que comienzan a aparecer en los tallos; 2=30-50% del total de la planta enferma, 3=50-70% del total de la planta enferma; 4=70-90% del total de la planta enferma y 5=planta muerta.

El potencial de los antagonistas como promotores de crecimiento también fue evaluado mediante la medición de la longitud de tallos y de raíz así como la germinación de las semillas. Cada tratamiento consistió de cuatro semillas en cuatro réplicas.



Figura 15. Ensayo de plántulas *in vitro*. A), Producción de esclerocios; B), Extracción de esclerocios; C), Inoculación de semillas con *B. thuringiensis*; D), Ubicación de tratamientos; E) y F), Daño por *R. solani*.

Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey, usándose en todos los casos un nivel de significancia de $P(\leq 0.05)$. Para todos los análisis, se usó la versión 6.12 del programa SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

De las plantas analizadas de las 44 diferentes localidades (Tabla V), se encontró la presencia de seis hongos previamente reportados local o globalmente como patogénicos al cultivo de chile. *R. solani* y *P. capsici* se detectaron en forma individual 15.90 y 2.27% respectivamente, pero también fue común detectar dos o más de ellos en una sola localidad. Los hongos más frecuentemente aislados fueron *R. solani* y *Fusarium* spp. con 70.45 y 65.90% respectivamente, *Verticillium* spp. (45.45%), *Colletotrichum* spp. (38.63%), *Sclerotium* spp. (20.45%) mientras que *P. capsici* solamente fue aislado en el 9.09% en las parcelas de diferentes tipos de chile en la zona productora del Estado de Durango.

La enfermedad se encontró en las seis entidades muestreadas, independientemente de la ubicación geográfica de la parcela y tipo de chile de donde se obtuvieron los 113 aislados, *R. solani* fue encontrado en 31 sitios de muestreo, *Fusarium* spp. en 29, *Verticillium* spp. en 20, *Colletotrichum* spp. en 19, *Sclerotium* spp. en 9, *P. capsici* en 4 y *Trichoderma* spp. en 2.

Las características morfológicas de *P. capsici* Leo. que se reconocieron fueron su micelio hialino, ramificado con hinchamientos, cenocítico, esporangios ovoides y globosos en esporangióforos ramificados, cuyas dimensiones largo por ancho

variaron de 42.8 a 54.5 por 29.8 a 38.5 μ , por otra parte las oosporas observadas fueron pleróticas, de pared gruesa, esféricas, con un diámetro que varió de 22 a 31 μ , permitiendo éstas su identificación, el género *Fusarium* se identificó por sus conidias de forma fusoide y *Rhizoctonia* por el micelio septado y sus ramificaciones a 90°.

6.2 Pruebas de calidad de la semilla de chile

6.2.1 Germinación estándar

Los resultados obtenidos en la prueba de germinación que se presentan en la tabla I (Apéndice), muestran diferencias altamente significativas entre lotes analizados ($P \leq 0.05$). En la Tabla VI, se observa que hay diferencia en germinación entre los lotes de semillas, el mayor porcentaje de germinación fue el lote número 3 con 90.5%, mientras el porcentaje más bajo fue presentado por el lote número 7 con 6.0%; los cuales fueron agrupados en tres, siendo el de calidad más alta los que presentaron germinación superior a 87.5%, teniendo un grupo intermedio de 72-86.5% y existiendo un grupo más con germinación baja (6-68%), por lo tanto se establece que desde la germinación los lotes presentaron diferencias en cuanto a capacidad de germinación dentro de ellos.

En la Tabla II (Apéndice), se puede observar diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) de los parámetros evaluados, plantas normales, plantas anormales y semillas no germinadas. En la Figura 16, se observa que destaca el lote número 3 el cual presenta mayor germinación de plantas normales (79.5%) y menor porcentaje de semillas no germinadas (9.5%). En contraparte a este, el lote número 7 se muestra

como el tratamiento que mostró mayor porcentaje de semillas no germinadas (97%) y solo un 3% de plantas normales.

Tabla V

Relación de fitopatógenos aislados e identificados en las plantas de chile colectadas en la zona productora del Estado de Durango, Méx.

Colecta	Origen	Chile	Hongos Identificados
1	Villa Unión	Puya	<i>R.solani</i>
2	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Esclerotium spp; Verticillium spp.</i>
3	Villa Unión	Tornachile	<i>R.solani</i>
4	El Potosí	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp.</i>
5	Amado Nervo	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
6	Amado Nervo	Puya	<i>Trichoderma spp; Verticillium spp. Colletotrichum spp.</i>
7	Amado Nervo	Ancho (H)	<i>Trichoderma spp; Verticillium spp.</i>
8	Villa Unión	Puya	<i>R.solani</i>
9	Villa Unión	Ancho	<i>R.solani, Fusarium spp.</i>
10	Villa Unión	Puya	<i>Fusarium spp; Colletotrichum spp.</i>
11	Villa Unión	Ancho	<i>Fusarium spp; Verticillium spp.</i>
12	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Esclerotium spp.</i>
13		Puya	<i>Fusarium spp; Colletotrichum sp.</i>
14	Villa Unión	Ancho	<i>Fusarium spp; Verticillium spp.</i>
15	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp.</i>
16			<i>R.solani</i>
17	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Colletotrichum spp.</i>
18	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
19			<i>Esclerotium spp; Verticillium spp. Colletotrichum spp.</i>
20	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp.</i>
21	Villa Unión	Ancho (H)	<i>R.solani, Fusarium spp.</i>
22	El Refugio	Ancho (H)	<i>R.solani, Fusarium spp.</i>
23	Villa Unión	Chilaca	<i>R.solani, Fusarium spp; Esclerotium spp.</i>
24		Ancho	<i>R.solani, Colletotrichum spp.</i>
25	Villa Unión	Chilaca	<i>Fusarium spp; Colletotrichum spp.</i>
26		Ancho	<i>R.solani, Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
27	Villa Unión	G. cristalino	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
28		Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
29		Puya	<i>Fusarium spp; Colletotrichum spp.</i>
30	Orizaba	Puya	<i>Fusarium spp; Colletotrichum spp.</i>
31	Villa Unión		<i>P. capsici</i>
32	Orizaba	Puya	<i>Fusarium spp; Esclerotium spp; Verticillium spp.</i>
33	Orizaba	Puya	<i>R.solani</i>
34	Villa Unión	Chilaca	<i>R.solani, Fusarium spp; Esclerotium spp; Colletotrichum spp.</i>
35	V. Guerrero	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
36	Orizaba	Ancho	<i>R.solani</i>
37	Villa Unión	Ancho	<i>R.solani, Fusarium spp; P. capsici</i>
38	Orizaba	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
39	Villa Unión	Ancho	<i>R.solani, P. capsici</i>
40	V. Guerrero	Puya	<i>R.solani</i>
41	Villa Unión	Ancho	<i>R.solani, Fusarium spp; Esclerotium spp; Verticillium spp.</i>
42	Villa Unión	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; P. capsici; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>
43	Orizaba	Puya	<i>R.solani, Fusarium spp; Esclerotium spp; Verticillium spp.</i>
44	Villa Unión	Ancho	<i>Fusarium spp; Esclerotium spp; Verticillium spp; Colletotrichum spp.</i>

Tabla VI

Comparación de medias para la variable respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.)^a

Lote ^a	% Germinación
3	90.5 a *
9	89.0 a
15	89.0 a
5	87.5 a
10	86.5 ab
16	82.5 bc
2	81.0 cd
11	80.0 cd
12	79.5 cd
1	76.5 de
8	74.5 e
4	72.0 ef
14	68.0 f
13	61.5 g
6	29.5 h
7	6.0 i

^aSemillas de 16 lotes de chile previamente desinfectadas con fungicida, se sembraron entre toallas de papel húmedo (Anchor) que se enrollaron en forma de taco sujetos con ligas en las extremidades y colocados en bolsas de polietileno para evitar la evaporación, se colocaron en una cámara de germinación de alta capacidad a una temperatura de 25±2°C con 16h luz/8h oscuridad de fotoperiodo. Al séptimo día se realizó un primer conteo, en el cual se anotaron las plántulas normales eliminándolas de la prueba, al día catorce se realizó el conteo final de germinación donde se anotaron plántulas normales. El porcentaje de germinación se obtuvo del promedio de las repeticiones para plántulas normales. *Valores seguidos por letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes determinaciones por triplicado por tratamiento (Tukey, P≤0.05).

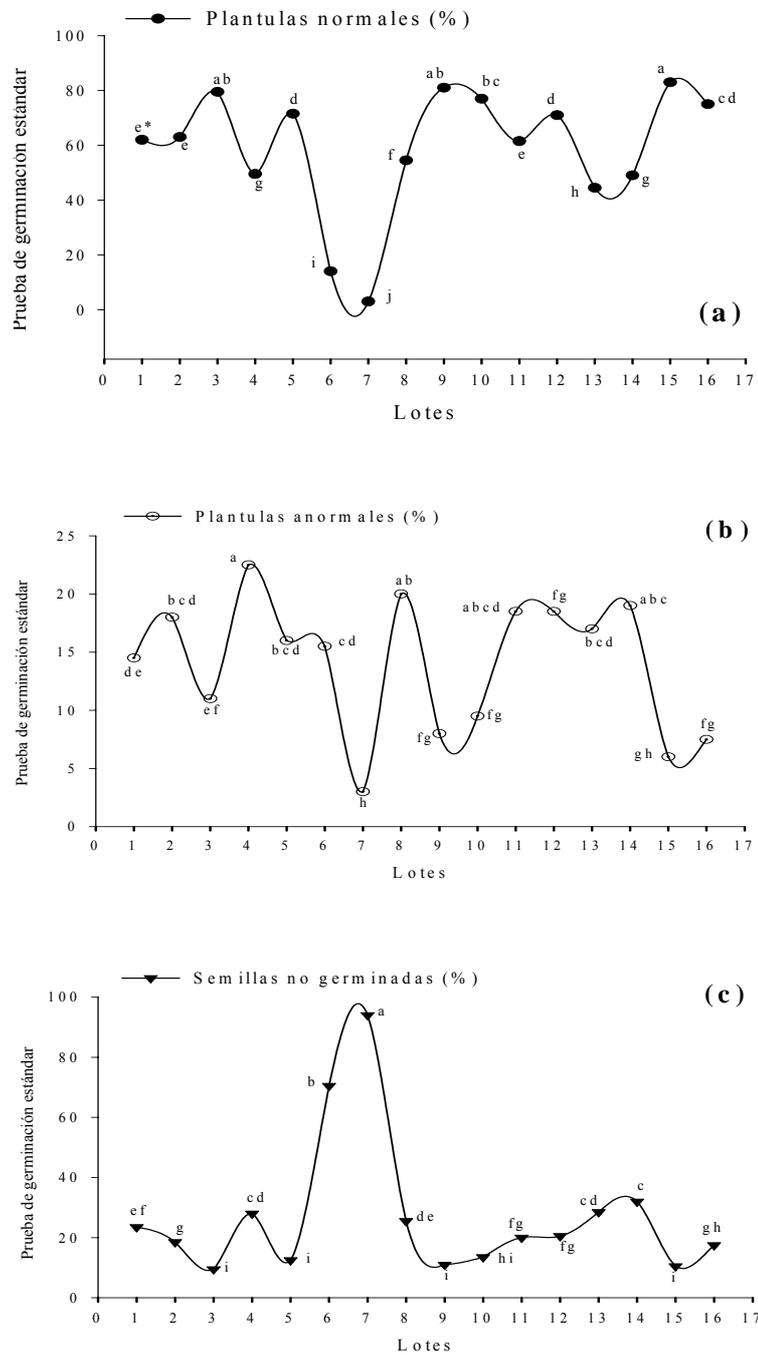


Figura 16. Respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de Chile. El primer conteo de germinación se determinó a los 7 días de incubación evaluando solo plántulas normales (a) y eliminándolas de la prueba; al día 14 se realizó el conteo final donde se evaluaron plántulas normales (a), anormales (b) y semillas sin germinar (c). Los datos representan la media de 4 repeticiones por tratamiento. *Valores seguidos por letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes determinaciones por triplicado por tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.2.2 Germinación en charola bandeja speedling

Los resultados de germinación que se presentan en la Tabla III (Apéndice), muestran diferencias altamente significativas entre lotes ($P \leq 0.05$), El coeficiente de variación (2.30%) se encuentra dentro de los rangos aceptables para las condiciones en que fue realizada la evaluación. En la Tabla VII, la comparación de medias de lotes para germinación en charola se observa que hay diferencia entre los lotes, estos fueron agrupados nuevamente en tres niveles, siendo el de calidad más alta los que presentaron germinación superior a 88%, teniendo un grupo intermedio de 75-85% y un grupo con germinación baja (0-39%), resaltando el lote número 3 con una germinación de 94% superior a todas las demás.

6.2.3 Envejecimiento acelerado

En la Tabla IV (Apéndice) se observan los cuadrados medios para envejecimiento acelerado para cada uno de los lotes de la semilla de chile sometidas a $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24 h, en cuanto al coeficiente de variación (C.V.= 4.83%) se encuentra dentro del límite aceptable para las condiciones en que se realizó la prueba. En la Tabla VIII, se observan las diferencias de medias para la germinación después de envejecimiento, en donde los lotes fueron divididos en tres grupos los de más alta germinación y por consecuencia más vigor con una germinación entre 60 y 64.75%, en los nuevamente lotes 3 y 13 que se encuentran dentro de este rango, en esta caso el 3, es evaluado como uno de los mejores lotes, el siguiente grupo se encuentra con una germinación entre el 34 y 58%, seguido por los lotes número 14, 6 y 8 con una germinación realmente pobre menor de 19%, siendo estos mismos el de vigor más bajo.

Tabla VII

Comparación de medias para la variable de respuesta de germinación en charola en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.)^a

Lote ^a	% Germinación
3	94.0 a*
16	92.0 ab
4	91.0 ab
5	88.0 bc
15	85.0 cd
9	85.0 cd
14	84.0 cd
8	84.0 cd
13	84.0 cd
11	83.0 d
1	78.0 e
10	76.0 e
2	76.0 e
12	75.0 e
6	39.0 f
7	00.0 g

^aSemillas de 16 lotes de chile previamente desinfectadas con fungicida, se sembraron en bandejas plásticas de 200 alvéolos (una semilla por alvéolo), usando como sustrato una mezcla de 80% turba (Peat moss ProMix) y 20% de perlita (Harbolite). A los 7, 11 y 14 días después de la siembra se contabilizaron las plántulas emergidas. *Valores seguidos por letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes, determinaciones de 4 repeticiones de 100 semillas por cada tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

Tabla VIII

Comparación de medias para la variable de respuesta germinación después de tiempo de envejecimiento acelerado (24 h) en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.)^a

Lote ^a	% Germinación
3	64.7 a
13	60.4 ab
9	58.5 ab
2	57.0 bc
11	54.0 cd
16	51.0 cd
5	49.0 cd
4	48.0 cd
10	46.5 cd
1	46.5 d
12	43.0 e
15	34.0 e
14	19.5 e
6	18.5 e
8	17.0 f
7	00.0 g

^aSe usaron vasos de precipitado graduados de 250 ml como cámara interna a los que se les agregó 50 ml de agua destilada, con una malla metálica dentro y una base de igual material como soporte donde se colocaron 100 semillas por cada lote distribuidas uniformemente. Después se taparon los vasos con papel aluminio delgado doblado en cuatro partes y se sellaron con ligas. Estos se colocaron en la cámara de envejecimiento con 90% de humedad relativa a $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 24 h, y una vez terminado el tiempo se realizó la prueba de germinación estándar evaluando a los siete y 14 días. En este se anotaron las plántulas normales, las que se reportaron como porcentaje de germinación después del envejecimiento, plántulas anormales y semillas muertas. La prueba se repitió 3 veces en laboratorio para evaluar la repetitividad de los resultados. *Valores seguidos por letras mayúsculas diferentes son significativamente diferente, determinaciones por triplicado por tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

En la Figura 17, se ven reflejados los resultados de las medias en los cuales observamos que el tratamiento que presentó mayor porcentaje de germinación (64.75%) fue el lote número 3, mientras que el porcentaje más bajo fue presentada por el lote número 8 con un 17% seguido por el lote número 6 con una germinación de 18.5%, eliminando el lote número 7 por su baja germinación en las pruebas anteriores.

Los resultados de los parámetros evaluados (plantas normales, plantas anormales y semillas sin germinar), donde el lote que presentó mayor porcentaje de plantas normales fue el lote número 3 con un 45% con la cantidad más baja de semillas no germinadas de 35.5%, seguido por el lote número 13 con un 42.5% de plantas normales y 39.5% de semillas no germinadas.

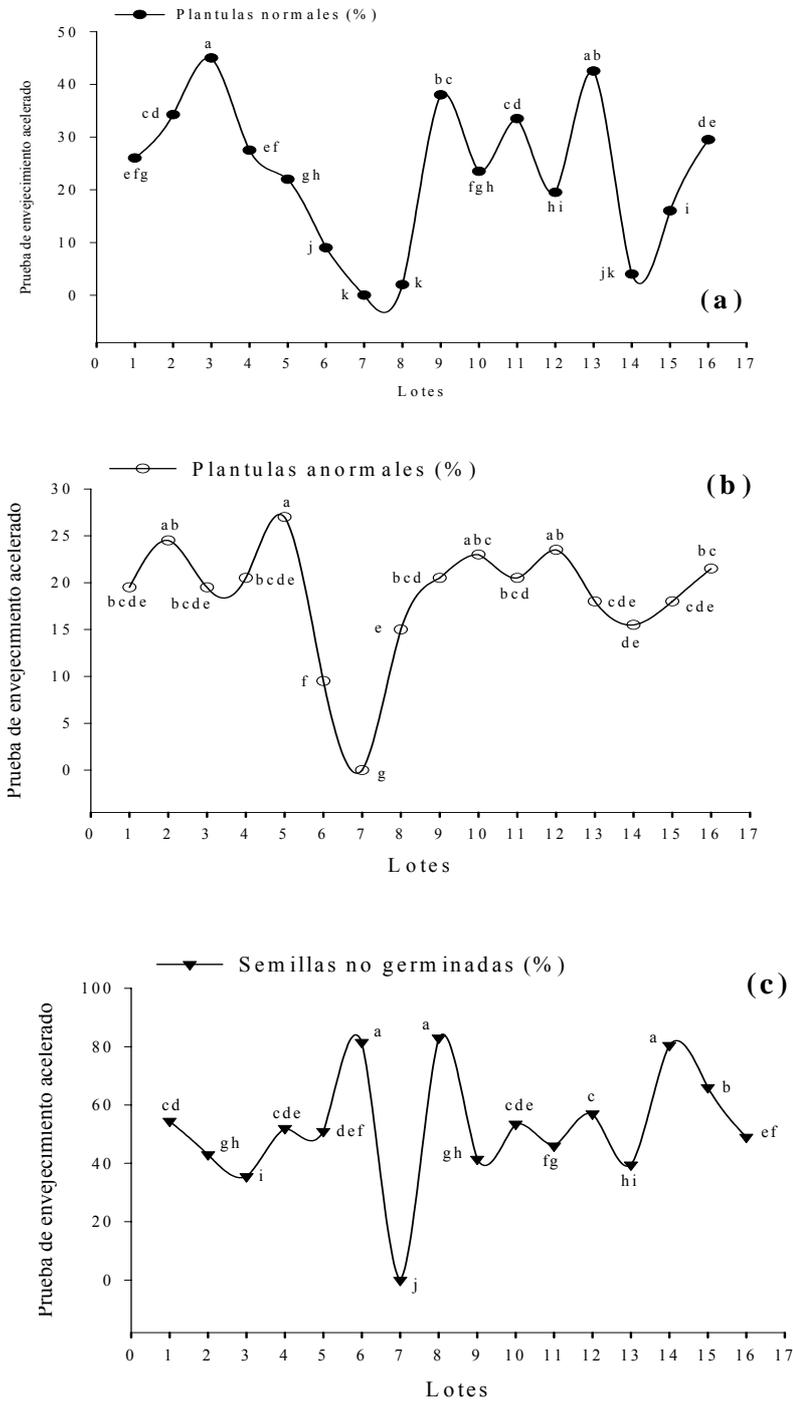


Figura 17. Respuesta de germinación estándar con envejecimiento acelerado en lotes de semilla de Chile. El primer conteo de germinación se determinó a los 7 días de incubación evaluando solo plántulas normales (a) y eliminándolas de la prueba; al día 14 se realizó el conteo final donde se evaluaron plántulas normales (a); anormales (b) y semillas sin germinar (c). Los datos representan la media de 4 repeticiones por tratamiento. Valores seguidos por letras mayúsculas diferentes son significativamente diferentes determinaciones por triplicado por tratamiento (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.2.4 Sanidad de semilla

En la Tabla IX, se muestra la presencia de cuatro de los principales patógenos de Chile, *Alternaria* spp., *S. sclerotiorum*., *Fusarium* spp. y *R. solani* en las muestras de semillas de los lotes probados, así como de otros fitopatógenos.

De manera general, fueron observados bajos índices de semillas infectadas con *S. sclerotiorum*, excepto para el lote 12, que presentó el mayor porcentaje de semillas con este hongo (17%). El período de incubación influyó en la detección de *S. sclerotiorum* siendo este mayor que en el caso de los demás (15 días en vez de 7), también se puede observar que el lote 12 fue susceptible a casi todos los fitopatógenos, con excepción del género *Cladosporium*.

Por otra parte *Alternaria* spp., *Curvularia* sp; *Dreschelera* sp. y *Fusarium* sp. se encontraron en el 100% de las colectas de semilla de Chile, sin embargo, en 7 lotes de semilla se encontró uno o más patógenos (*Fusarium* spp. y/o *Rhizoctonia* spp.) causantes de ahogamiento en almácigos, aunque *Fusarium* (12 de 15 lotes) fue más frecuente que *Rhizoctonia* spp. (7 de 12 colectas), solamente en nueve colectas de semilla se identificó a *Penicillium* spp.

Las semillas del lote 1, a pesar de no presentar un buen índice de vigor y de no estar dentro del promedio de germinación del Chile, no resultaron en plántulas infectadas, con una visible ventaja en el aspecto de sanidad en relación con los demás lotes. Los lotes 7 y 6 presentaron bajos índices de vigor de las semillas y germinación de plántulas normales, presentando en cambio altos índices de las plántulas anormales e infectadas y un mayor índice de semillas muertas (77 y

Tabla IX

Incidencia (%) de hongos en semilla de 12 lotes de chile, detectados por el método de la placa de agar.

Hongos	Lotes*											
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12
<i>Alternaria sp.</i>	20	25	14	19	30	10	10	21	27	9	29	2
<i>Aspergillus sp.</i>	0.25	0.25	0.5	3	1	1	1	0.25	3	0	0.25	2
<i>Botrytis sp.</i>	0	0.25	0	0.25	2	0	0	0	0	0	0	0.5
<i>Chaetomium sp.</i>	0.25	0	0	0.25	1	0	0.5	0.25	0	0	0	0.5
<i>Cladosporium sp.</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.25	0
<i>Curvularia sp.</i>	21	14	20	30	20	7	11	22	7	15	26	9
<i>Dreschlera sp.</i>	20	29	17	31	15	57	21	23	18	31	12	17
<i>Fusarium sp.</i>	63	59	49	43	49	27	75	59	47	52	41	40
<i>Penicillium sp.</i>	0.25	0.25	1	4	0	7	0.25	2	7	0	0	37
<i>Phoma sp.</i>	3	1	0.5	8	4	0	3	0.5	0.25	0	0	10
<i>Rhizoctonia sp.</i>	1	0	0.25	0	0.25	0.25	0.25	0	0	0	0.25	1
<i>Rhizopus sp.</i>	0	0	4	0	0.25	0	0	0	0	0	1	0.25
<i>S. sclerotiorum</i>	3	20	4	0.5	2	4	4	4	4	2	4	17
<i>Trichoderma sp.</i>	0	0	0	1	0.25	0.25	0	0	0.25	2	0.25	3
% Germinación*	73	66	84	83	92	67	27	79	79	82	81	90

Semillas de chile fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 3 minutos, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada y una vez con alcohol al 70% durante 1 minuto, Las semillas desinfectadas y secadas se colocaron en grupos de 10 en cajas Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA y se sellaron con parafilm e incubadas a 26±2°C y 16 h luz/8 h oscuridad de fotoperiodo. El porcentaje de germinación y la sanidad de la semilla se determinó conjuntamente, evaluando inicialmente a los siete días y terminando a los 15 días después de la siembra, las colonias de hongos que crecieron en la semilla se identificaron en base a la observación de caracteres macro-microscópicos y el uso de claves apropiadas Se cuantificó el número de géneros fúngicos desarrollados y el porcentaje de germinación de las semillas. El criterio para evaluar la efectividad de los métodos de análisis sanitarios se basó en el número de géneros fúngicos desarrollados a partir de las semillas presentes por cada unidad experimental, en este caso por cada petri. *Media de 4 repeticiones Se utilizaron 100 semillas por muestra.

33%, respectivamente). Los hongos detectados no tuvieron influencia sobre el vigor y germinación de plántulas normales, esto puede ser constatado al observar que los índices de vigor y germinación de plántulas normales de los lotes 5, 12, 3 y 4 fueron relativamente altos a pesar de que ambos presentaron un mayor número de patógenos asociados con sus semillas.

Entretanto, se puede asociar que los bajos porcentajes de vigor de los lotes 1, 9 y los bajos índices de plántulas normales de los lotes 7 y 11 están relacionados con los altos porcentajes de semillas portadoras de *Fusarium* sp.

6.3 Antagonismo *in vitro* de *B. thuringiensis* contra *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*

Entre las 64 cepas GM y HD de *B. thuringiensis* probadas (Tabla X y XI), resultaron ser buenas antagonistas contra *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* en ensayos de cultivos duales, en donde la inhibición fue observada claramente por crecimiento limitado o por la ausencia completa del micelio fúngico en la zona de inhibición que rodeaba a la cepa bacteriana.

16 cepas de *B. thuringiensis* tuvieron efectos antagonista en el crecimiento micelial de *R. solani* (Tabla XII). Las cepas GM-64 (66.66%) y HD-203 (65.99%) presentaron la mayor inhibición de crecimiento ($p \leq 0.05$), mientras que la cepa HD-597 presentó el menor porcentaje de inhibición (34.4%), observándose también una reducción en la tasa de crecimiento micelial de 3.98 a 0.6 cm/día.

Para *P. capsici* 19 cepas de *B. thuringiensis antagonistas* se comportaron de una manera muy similar con porcentajes de inhibición del 15.14 al 27.80% correspondientes a las cepas HD-193 y Gm-66 respectivamente y una reducción en la tasa de crecimiento de 2.86 a 1.26 cm/día (Tabla XIII).

Solo ocho cepas mostraron un efecto inhibitorio ($p \leq 0.05$) contra *F. oxysporum* (Tabla XIV), de las cuales cinco inhibieron más del 30% del crecimiento, alcanzándose la máxima inhibición con la cepa GM-23 con un 43.02% y con una reducción en la tasa de crecimiento de 0.52 al 0.10 cm/día. Por otro lado al realizar observaciones bajo el microscopio de luz, se observó una disminución en el desarrollo y en la densidad del micelio en la zona de confrontación.

6.3.1 Efecto de *B. thuringiensis* sobre la germinación de semillas de chile

En las semillas tratadas con cepas de *B. thuringiensis* se incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) el porcentaje de germinación bajo condiciones *in vivo* solo para el tratamiento correspondiente a la inoculación de *B. thuringiensis*+*R. solani* (Tabla XV), en este caso varió entre un 100% (GM-52) y un 25.0% (HD-597), destacándose las siguientes cepas por los altos porcentajes de germinación registrados: GM-6 (93.75%), HD-571, GM-24, HD-203, y GM-64 (87.5%), GM-23, HD-263, HD-652, GM-63 y HD-121 (75.0%). El resto de los tratamientos no fueron estadísticamente diferentes respecto al control (Tabla XVI y Tabla XVII).

Tabla X

Inhibición de *R. solani*, *P.capsici* y *F. oxisporum* por cepas de *B. thuringiensis* (GM).

<i>B. thuringiensis</i> (GM) Cepa N°	Cepas de fitopatógenos		
	<i>R. solani</i>	<i>P.capsici</i>	<i>F. oxisporum</i>
GM-5			
GM-6	■	■	
GM-7		■	
GM-8		■	
GM-11	■	■	
GM-13			
GM-18			
GM-20			
GM-23	■		■
GM-24	■		
GM-26			
GM-27			
GM-28			
GM-29			■
GM-33		■	
GM-39			
GM-46			
GM-51		■	
GM-52	■		
GM-54			
GM-55			
GM-63	■	■	
GM-64	■		
GM-66		■	
GM-69			
GM-88			
GM-84			
GM-92		■	
GM-93			
GM-104			
GM-109			
GM-115			
GM-116	■		
GM-138			
GM-162	■		
GM-235			
GM-615			

Inhibición del crecimiento ■ No inhibición del crecimiento □

Tabla XI

Inhibición de *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxisporum* por cepas de *B. thuringiensis* (HD).

<i>B. thuringiensis</i> (HD) Cepa N°	Cepas de fitopatógenos		
	<i>R. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>F. oxisporum</i>
HD-1			
HD-14			
HD-24			
HD-57			
HD-116			
HD-121			
HD-133			
HD-184			
HD-187			
HD-193			
HD-203			
HD-263			
HD-244			
HD-333			
HD-501			
HD-530			
HD-531			
HD-559			
HD-569			
HD-571			
HD-577			
HD-597			
HD-615			
HD-650			
HD-652			
HD-972			
HD-974			

Inhibición del crecimiento No inhibición de crecimiento

Tabla XII

Efecto antagonista de cepas de *B. thuringiensis* en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de *R. solani*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	C.R. (mm) ^w	T.C. (cm/día) ^x	% Inhibición ^y
HD-121	14.08	0.83	62.44 a
HD-203	12.75	0.21	65.99 a
HD-263	16.50	0.6	55.99 ab
HD-571	18.66	0.71	50.22 ab
HD-652	16.41	0.8	56.22 ab
HD-597	24.58	1.83	34.44 b
HD-974	14.41	0.56	61.55 a
GM-6	13.75	0.68	63.33 a
GM-11	14.16	0.7	62.21 a
GM-23	13.50	0.23	63.99 a
GM-24	14.75	0.65	60.66 a
GM-52	15.00	0.83	59.99 a
GM-63	15.91	0.71	57.55 a
GM-64	12.50	0.65	66.66 a ^z
GM-116	19.58	1.51	47.77 ab
GM-162	17.08	0.96	54.44 ab
Control	37.50	3.98	00.00 c

^wC.R.= Crecimiento radial en mm.

^xT.C.= Tasa de crecimiento diario en cm.

^yIncubación durante 72 hr a 22±2°C.

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a (P≤0.05) por la prueba de Tukey.

Tabla XIII

Efecto antagonista de cepas de *B. thuringiensis* en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de *P. capsici*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	C.R. (mm) ^w	T.C. (cm/día) ^x	% Inhibición ^y
HD-24	20.83	1.71	22.87 a
HD-133	13.66	1.55	24.37 a
HD-116	20.83	1.76	22.86 a
HD-193	22.91	2.23	15.14 a
HD-244	20.83	1.46	22.80 a
HD-263	22.33	2.18	17.23 a
HD-333	21.33	1.61	20.93 a
HD-531	20.00	1.26	25.97 a
HD-559	21.50	2.35	20.34 a
HD-974	20.83	1.58	22.87 a
GM-6	21.16	1.6	21.56 a
GM-7	20.58	1.83	23.73 a
GM-8	19.91	2.13	26.04 a
GM-11	20.50	1.85	24.07 a
GM-33	21.50	1.65	20.66 a
GM-51	20.00	1.45	25.89 a
GM-63	20.50	1.73	24.11 a
GM-66	19.50	1.51	27.80 a ^z
GM-92	20.50	1.8	24.15 a
Control	27.00	2.86	00.00 b

^wC.R.= Crecimiento radial en mm.

^xT.C.= Tasa de crecimiento diario en cm.

^yIncubación durante 72 hr a 22±2°C.

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a (P≤0.05) por la prueba de Tukey.

Tabla XIV

Efecto antagonista de cepas de *B. thuringiensis* en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de *F. oxisporum*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	C.R. (mm) ^w	T.C. (cm/día) ^x	% Inhibición ^y
HD-121	12.16	0.10	42.04 a ^z
HD-501	13.66	0.28	40.10 ab
HD-530	14.16	0.29	29.21 ab
HD-652	13.08	0.17	25.37 b
HD-577	13.66	0.28	39.01 ab
HD-974	13.83	0.27	36.72 ab
GM-23	10.75	0.15	43.02 a
GM-29	14.41	0.21	29.84 ab
Control	19.25	0.52	00.00 c

^wC.R.= Crecimiento radial en mm.

^xT.C.= Tasa de crecimiento diario en cm.

^yIncubación durante 72 hr a 22±2°C.

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a (P≤0.05) por la prueba de Tukey.

Tabla XV

Efecto de cepas *B. thuringiensis* en la germinación de semillas de chile inoculadas con *R. solani*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	% Germinación
HD-121	75.00 a
HD-203	87.05 a
HD-263	75.00 a
HD-571	87.05 a ^z
HD-652	75.00 a
HD-597	25.00 bc
HD-974	62.05 b
GM-6	93.75 a
GM-11	50.00 ab
GM-23	75.00 a
GM-24	87.05 a
GM-52	100.00 a
GM-63	75.00 a
GM-64	87.05 a
GM-116	62.05 ab
GM-162	62.05 ab
Control	93.75 a
Control + <i>R. solani</i>	00.00 c

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Tabla XVI

Efecto de cepas *B. thuringiensis* en la germinación de semillas de chile inoculadas con *P. capsici*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	% Germinación
HD-24	75.00 a
HD-133	75.00 a
HD-116	75.00 a
HD-193	75.00 a
HD-244	75.00 a ^z
HD-263	62.05 a
HD-333	75.00 a
GM-51	62.05 a
HD-531	75.00 a
HD-559	50.00 a
HD-974	75.00 a
GM-6	87.05 a
GM-7	50.00 a
GM-8	62.05 a
GM-11	75.00 a
GM-33	75.00 a
GM-63	87.05 a
GM-66	87.05 a
GM-92	50.00 a
Control	93.75 a
Control + <i>P. capsici</i>	62.05 a

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

Tabla XVII

Efecto de cepas *B. thuringiensis* en la germinación de semillas de chile inoculadas con *F. oxisporum*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	% Germinación
HD-121	87.05 a
HD-501	81.25 a
HD-530	50.00 a
HD-652	87.05 a ^z
HD-577	87.05 a
HD-974	87.05 a
GM-23	62.05 a
GM-29	75.00 a
Control	93.75 a
Control + <i>F. oxisporum</i>	87.05 a

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

6.4 Antagonismo in vitro de *B. thuringiensis* contra *R. solani*

6.4.1 Producción de antibióticos volátiles

Las seis cepas evaluadas fueron significativamente diferentes en relación con el control ($p \leq 0.05$). Las cepas GM-11 y GM-121 de *B. thuringiensis* fueron las bacterias antagonistas que mostraron el mejor efecto (en cultivos de 72 h) contra *R. solani* con un porcentaje de inhibición de crecimiento de 76.88 y 74.66 respectivamente (Tabla XVIII). Sin embargo, todas las cepas mostraron un efecto inhibitorio en mayor o menor grado con respecto al control.

Tabla XVIII

Efecto de antibióticos volátiles secretados por *B. thuringiensis* en el crecimiento radial de *R. solani*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	C.R. (mm) ^y	% Inhibición
GM-11	8.66	76.88 a ^z
GM-121	9.5	74.66 a
GM-64	10.33	72.44 ab
HD-203	11.16	70.21 ab
GM-23	12.91	65.55 bc
GM-6	14.58	61.10 c
Control	37.5	0.00 d

^yCrecimiento de *R. solani* en PDA durante 72 horas a 25°C.

^zLetras diferentes indican que las medias son significativamente diferentes a ($P \leq 0.05$) por la prueba de Tukey.

6.4.2 Filtrado de antibióticos

Después del ensayo de filtrados no se observaron evidencias de actividad antagónica de *B. thuringiensis* para el control de *R. solani* (Tabla XIX).

Tabla XIX

Efecto de filtrados de antibióticos por *B. thuringiensis* en el crecimiento radial de *R. solani*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	C.R. (mm) ^y	% Inhibición
GM-6	37.5	0.00
GM-11	37.5	0.00
GM-23	37.5	0.00
GM-64	37.5	0.00
GM-121	37.5	0.00
HD-203	37.5	0.00
Control	37.5	0.00

^yCrecimiento de *R. solani* en PDA durante 72 horas a 25°C.

6.4.3 Termoestabilidad de antibióticos

Después del ensayo de termoestabilidad no se observaron evidencias de actividad antagónica de *B. thuringiensis* para el control de *R. solani* (Tabla XX).

Tabla XX

Efecto de antibióticos termoestables por *B. thuringiensis* en el crecimiento radial de *R. solani*.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	C.R. (mm) ^y	% Inhibicion
GM-6	37.5	0.00
GM-11	37.5	0.00
GM-23	37.5	0.00
GM-64	37.5	0.00
GM-121	37.5	0.00
HD-203	37.5	0.00
Control	37.5	0.00

^yCrecimiento de *R. solani* en PDA durante 72 horas a 25°C.

6.4.4 Ensayo de plántulas *in vitro*

Se evaluó la eficiencia de los antagonistas en el control de *R. solani* en Chile mediante la técnica de ensayo en plántulas (Tabla XXI). En el control inoculado con *R. solani*, las lesiones parduzcas, características de la infección, aparecieron a partir del cuarto día de inoculado y estas se extendieron hacia el segmento superior de las plántulas, mientras que en las plántulas tratadas con las bacterias antagonistas mostraron una reducción en la aparición de las manchas parduzcas.

De entre todas las cepas sólo GM-23, GM-11 y GM-121 mostraron la máxima reducción de severidad de la enfermedad en las plántulas de Chile. Además las plántulas tratadas con cepas antagonistas mostraron tener un efecto promotor del crecimiento de tallos y raíces en comparación con las longitudes alcanzadas en el control.

El mayor efecto se obtuvo con la GM-23, con la cual se observó un incremento de la longitud de tallo y raíz en un 18.9 y 25.5% respectivamente, comparado con el control inoculado con *R. solani*. Por otro lado, las cepas GM-121 y GM-6 de *B. thuringensis* no afectaron el desarrollo de las plántulas.

Tabla XXI

Efecto antagónico de *B. thuringiensis* en el desarrollo de la enfermedad causada por *R. solani* y en el crecimiento de plántulas de chile.

<i>B. thuringiensis</i> Cepa N°	Severidad de la enfermedad ^{wx}	Germinación ^x	Crecimiento de plántulas ^x	
			Longitud tallo (mm)	Longitud raíz (mm)
GM-6	4.0±0.00	90.0±5.77	12.2±2.50	23.2±6.19
GM-11	3.0±0.00	95.0±5.0	10.2±1.09	14.9±2.35
GM-23	2.0±0.00	95.0±5.00	18.9±0.36	25.5±3.83
GM-64	4.0±0.00	90.0±5.77	10.8±2.08	11.2±1.68
GM-121	3.0±0.00	90.0±5.77	12.0±0.66	25.3±2.01
HD-203	4.0±0.00	95.0±5.00	13.8±1.39	17.8±1.81
<i>R. solani</i>	5.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
Control	--	95.0±5.00	27.42±0.53	25.2±0.35

^wSeveridad de la enfermedad fue determinada usando una escala de 0-5, donde 0- sin síntomas visibles de la enfermedad y 5- planta muerta.

^xResultados de 4 repeticiones

± Error estándar

7. DISCUSIÓN

La enfermedad conocida como secadera del chile está ampliamente distribuida en todas las zonas productoras de chile, provocando pérdidas de hasta el 100 % en este cultivo (Chávez *et al.*, 1994). Desde 1922, Leonian reportó a *P. capsici* Leo. atacando cultivos de pimiento en Nuevo México; Estados Unidos, mientras que en México fue aislado por Galindo en 1956 (citado por Mendoza y Pinto, 1983) en plantaciones de chile en Chapingo Edo. de México, aunque posteriormente se descubrió atacando otros cultivos; en el cultivo de chile los síntomas reportados son secamiento o ahogamiento en plántulas y pudrición en la base del tallo en plantas adultas.

La asociación de los síntomas de pudrición de la base del tallo o secadera del chile con la presencia de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *P. capsici* Leo. encontrados en este trabajo no concuerdan del todo con lo expresado anteriormente por Leonian (1922), Mendoza y Pinto (1983) y Chávez y col. (1994), quienes mencionan que este síntoma es causado por *P. capsici* Leo. en chile. Sin embargo, hacen mención de que los síntomas y la apariencia general de esta enfermedad no deben confundirse con el ataque de *Rhizoctonia solani*, ya que éste causa una pudrición no compacta en el cuello y se desprende la raíz, mientras que *P. capsici* Leo. provoca una pudrición dura y no se descascara.

Lo anterior concuerda, en parte, con los resultados obtenidos en el presente estudio donde el 66% de los aislamientos obtenidos de plantas muestreadas con síntomas visibles de secadera se identificaron como *Rhizoctonia* spp., mientras que el 25% fueron identificados como *Fusarium* spp. y únicamente el 9% se identificó como *P. capsici* Leo.

Por otro lado, no se han encontrado reportes previos en donde se indique que los síntomas de la secadera del chile estén asociados a *Fusarium* spp. El hongo más ampliamente localizado en las comunidades muestreadas fue *Rhizoctonia* spp. debido principalmente a que los síntomas visibles son muy similares a los asociados a *P. capsici* Leo. Con los resultados anteriores se recomienda que en trabajos futuros se realicen pruebas de patogenicidad, en donde se cumpla con los postulados de Koch para definir él o los agentes causales de la enfermedad denominada secadera del chile, así como trabajos en donde se determine la especie de los hongos *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. asociada a dicha enfermedad.

La calidad fisiológica de las semillas es evaluada rutinariamente en laboratorio, por la prueba de germinación estándar, aunque durante varios años, investigadores, tecnólogos, productores de semillas y agricultores no están satisfechos con la información obtenida sólo con esta prueba, realizado en condiciones que, generalmente, conducen a sobreestimar el potencial fisiológico de las semillas para dar origen a plántulas normales (Marcos Filho *et al.*, 1987; Caliarí y Marcos Filho, 1990). La experiencia de quienes se dedican a la tecnología de semillas indican con gran frecuencia, que la calidad fisiológica de semillas es influenciada por el medio ambiente.

Por lo tanto, las condiciones del ambiente pueden no ser las ideales al momento de la siembra y el porcentaje de emergencia de plántulas puede ser inferior a la germinación determinada en laboratorio (Marcos Filho *et al.*, 1987). Lo anterior queda constatado en este experimento.

En la prueba de germinación en charola bandeja speedling los lotes presentaron diferencias en cuanto a capacidad de germinación dentro de ellos. El índice de emergencia en charola indica similitud entre los lotes en cuanto a potencial fisiológico con excepción en el lote 6 y 7. La discordancia entre los resultados obtenidos en esta prueba sugiere, justamente, la necesidad de realizar un mayor número posible de pruebas antes de clasificar a los lotes en cuanto al potencial fisiológico, pues cada prueba está basada en un principio diferente y proporciona información complementaria para tomar una decisión con respecto al destino final de cada lote de semillas. Para Marcos Filho (1999), la prueba de emergencia de plántulas constituye un indicador de eficiencia para las pruebas de evaluación del potencial fisiológico de lotes de semillas.

La significancia de la prueba de envejecimiento acelerado entre los tiempos se debe a que al mantener las semillas un mayor tiempo de exposición a altas temperaturas y alta humedad, el estrés es mayor y con ello la reducción de vigor es también mayor, aunado a esto, el tiempo de incubación permite expresar la sensibilidad y efectividad en corto tiempo, de tal manera que el mejor tiempo en nuestro experimento fue de 24 h, confirmando lo observado por otros autores en cuanto a que el envejecimiento en condiciones de saturación de humedad causaría un deterioro demasiado severo en las semillas (Jianhua y McDonald, 1996; Wang *et al.*,

1996); además los resultados muestran una similitud a lo encontrado por Sánchez (1994) en semillas de jitomate.

De acuerdo con Hampton y Tekrony (1995), los lotes de semillas que mantuvieron su germinación después del deterioro son considerados lotes de alto vigor y aquellas en donde disminuyó la habilidad para germinar son consideradas de bajo vigor.

Independientemente de la asepsia y desinfección de las semillas de chile, los resultados de los análisis sanitarios de lotes de semillas probadas, demostraron la presencia de cuatro de los principales patógenos de chile, *Alternaria* spp., *S. sclerotiorum*., *Fusarium* spp. y *R. solani*, así como de otros fitopatógenos. De manera general, fueron observados bajos índices de semillas infectadas con *S. sclerotiorum*, excepto para el lote 12, que presentó el mayor porcentaje de semillas con este hongo (17%).

El período de incubación influyó en la detección de *S. sclerotiorum* siendo mayor que en los demás (15 días en vez de 7) debido a la formación de esclerocios, principal característica morfológica de este hongo. También se puede observar que el lote 12 fue susceptible a casi todos los fitopatógenos, con excepción del género *Cladosporium*, lo que puede indicar una baja calidad sanitaria de sus semillas.

La presencia de contaminantes como *Aspergillus* spp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. puede ser debido a que las semillas analizadas fueron almacenadas por los agricultores casi medio año bajo diferentes condiciones, siendo considerados los principales hongos de almacén (Lucca Filho, 1995).

Alternaria spp; *Curvularia* sp; *Dreschelera* sp. y *Fusarium* sp. se encontraron en el 100 % de las colectas de semilla de Chile, independientemente del origen geográfico y tipo de Chile. Sin embargo, en 7 lotes de semilla se encontró uno o más patógenos (*Fusarium* spp. y/o *Rhizoctonia* spp.) causantes de ahogamiento en almácigos, aunque *Fusarium* se presentó en 12 lotes y *Rhizoctonia* spp. en 7 lotes y solamente en nueve colectas de semilla se identificó a *Penicillium* spp.

De estos tres hongos aislados de plántulas de Chile en la región solo *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. son responsables del ahogamiento (Black *et al.*, 1991; Goldberg, 1995), por lo que se enfatiza la importancia del tratamiento a la semilla previo a la siembra, aunque esta medida se verá al menos parcialmente nulificada si el suelo del almacigo no es desinfectado también. No se encontró al hongo *Phytophthora* spp. en la superficie de la semilla, aunque existen reportes de su presencia en la testa, endospermo y embrión (Morales-Valenzuela *et al.*, 2002).

La prueba de cultivo dual es extensamente usada como una de las pruebas preliminares *in vitro* para seleccionar agentes de control biológico (Desai *et al.*, 2002), en el presente estudio, la prueba de cultivos duales mostro que de las 64 cepas de *B. thuringiensis* evaluadas 34 presentaron diferentes capacidades para inhibir a *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum*; Gm-64 presento mayor inhibición de crecimiento (66.66%) contra *R. solani*; Las cepas HD-263, GM-63, HD-974, GM-6 y GM-11 fueron comunes para *R. solani* y *P. capsici*; HD-652, HD-121 y GM-23 para *R. solani* y *F. oxisporum* y HD-974 *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxisporum*.

Está ampliamente documentado que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos (Di Pietro *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1999). El efecto inhibitor de las cepas de *B. thuringiensis* en hongos fitopatógenos se puede asociar con la producción de enzimas que actúan contra la pared celular, puesto que algunas bacterias antagónicas de hongos fitopatógenos producen quitinasas (Asaka y Shoda, 1996; Mavingi y Heulin, 1994).

En México se han seleccionado y caracterizado las enzimas quitinolíticas de *B. thuringiensis*, y han llegado a la conclusión de que la acción sinérgica entre las quitinasas y las proteínas Cry se pueden utilizar en el control biológico de fitopatógenos (Barboza *et al.*, 1999). Fenómenos similares fueron observados por Basha y Ulaganathan (2002), quienes también encontraron, vía microscopio de luz en la interacción *in vitro* de *Bacillus* sp. cepa BC121 contra *Curvularia lunata*, la presencia anormal de hifas, condensación, deformación y ocurrencia de malformaciones extensivas y daños al micelio.

Emmert y Handelsman (1999), reportaron que *Bacillus cereus* modifica la composición iónica del medio de cultivo en el que fueron cultivadas, aumentando el pH, secuestrando calcio y excretando amonio. Esta combinación es altamente tóxica a las zoosporas de oomycetes patógenos, causando un rápido ensanchamiento y expulsión de la vacuola, seguido de lisis de las zoosporas. De hecho, *Bacillus* sp. actúa vía antibiosis, competición de nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia (Jacobsen y Backman, 1993; Kloepper *et al.*, 2004).

El tratamiento a semillas de chile con *B. thuringiensis* fue favorable, ya que incrementó de manera significativa el porcentaje de germinación, estos resultados han sido previamente observados en varias especies de *Bacillus* (Raupach y Kloepper, 1998). Se debe destacar el comportamiento de las cepas sobre los diferentes fitopatógenos, ya que algunas resultaron ser sobresalientes por su efecto antifúngico contra alguno de los hongos, no teniendo el mismo efecto contra otros, como la cepa GM-6 (93.75%) a *R. solani* y 87.5% a *P. capsici*, o la cepa HD-974 62.5% a *R. solani*, 75.0 a *P. capsici* y 87.5 a *F. oxysporum*.

Estos resultados sugieren la variabilidad existente entre cepas aunque algunos autores (Schippers *et al*, 1987), reportaron la especificidad de los antibióticos producidos por bacterias. Bettioli y Lazaretti, en 1997 probaron metabolitos de *B. subtilis* en semillas de frijol, mostrando una disminución en la incidencia de *R. solani*; mientras que en semillas de arroz no se observó un efecto similar.

En el caso de *Fusarium* spp. los autores notaron una disminución de su incidencia en semillas de arroz, aunque no se observaron resultados positivos en semillas de frijol. Las bacterias antagonistas del genero con *Bacillus* actúan a través de la simbiosis de un modo significativo, y ocasionalmente a través de parasitismo y competencia (Arras y Arru, 1997), estos datos confirman los resultados de este trabajo, esto es, la eficacia y el posible efecto fúngico de los metabolitos que *B. thuringiensis* produce.

Bacillus spp. es uno de los agentes de control biológico que ha mostrado un efecto inhibitorio contra un considerable número de patógenos de plantas y se cree

que los antibióticos que produce son los responsables de ésta actividad de control (Helbig *et al.*, 1998; Krebs *et al.*, 1998).

En esta investigación, se usaron cepas de *B. thuringiensis* con actividad antifúngica *in vitro* con el fin de seleccionar aquellas con el mayor potencial para ser usadas contra *R. solani*. Algunos autores han sugerido que el uso de especies con actividad antimicrobial, entre ellas cepas del género *Bacillus*, o más aún el uso de sus metabolitos, pueden ser una alternativa o un método suplementario a la protección de cultivos por métodos químicos (Handelsman *et al.*, 1990; Klich *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1996; Sharga y Lyon, 1998).

Muchos de estos bacilos son habitantes habituales del suelo o permanecen de manera epifítica o endofítica en la espermosfera (Walker *et al.*, 1998) y rizósfera (McKeen *et al.*, 1986; Handelsman *et al.*, 1990; Kajimura *et al.*, 1995). Por esta razón, las especies de *Bacillus* son candidatos ideales para su uso como agentes de control biológico para su uso en los tratamientos a las semillas dentro de los programas de control de patógenos del suelo causantes de enfermedades de las plantas (Walker *et al.*, 1998).

El efecto inhibitorio de algunas cepas de *B. thuringiensis* sobre hongos fitopatógenos se puede asociar con la producción de enzimas que actúan sobre la pared (Asaka y Shoda, 1996; Mavingui y Heulin, 1994). En éste contexto, en Mexico Barboza *et al.*, (1999) ha seleccionado y caracterizado enzimas de *B. thuringiensis* (quitinasas) y ha llegado a la conclusión de que la actividad sinergista entre las

quitinasas y proteínas Cry puede ser aplicada en el control biológico de fitopatógenos.

Se han encontrado evidencias de que los metabolitos secundarios producidos por ciertas especies y cepas del género *Bacillus* muestran actividad antibacterial y/o antifúngica contra microorganismos patógenos de los alimentos y de las plantas (Shoji, 1978; Smirnov *et al.*, 1986). En este trabajo se emplearon diferentes métodos de escrutinio para seleccionar las cepas más adecuadas para su uso en el control de *R. solani* en Chile. Primero, se usó el tradicional ensayo *in vitro* de cultivos duales (en PDA) para medir la capacidad antagonista de las diferentes cepas. De las sesenta cepas evaluadas sólo 16 mostraron un efecto inhibitorio, de estas 16 cepas se eligieron 6 cepas para ser evaluadas tanto en ensayos de antibióticos volátiles, termoestabilidad y pruebas en plántulas, basándonos en la interacción entre el patógeno, antagonista y planta hospedero.

En la prueba de filtrados de antibióticos no se obtuvo un efecto positivo, debido posiblemente a que los productos extracelulares acumulados durante el crecimiento de *B. thuringiensis* no alcanzaron los niveles apropiados para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos probados en este estudio o a que la actividad antagonista está asociada a la fracción celular del antagonista, es decir, se necesitan las células activas para que haya una supresión del crecimiento del patógeno (Smith *et al.*, 1993).

En el ensayo de termoestabilidad no se observaron evidencias de actividad antagonista de *B. thuringiensis* para el control de *R. solani* en Chile. Esto pudo haber

sido debido a que algunos antibióticos y toxinas no son termoestables, de manera que cuando el filtrado fue esterilizado en autoclave los metabolitos que las bacterias habían producido durante su desarrollo pudieron haberse inactivado (Dhingra y Sinclair, 1987).

En los ensayos con plántulas, la mayoría de las cepas antagonistas (GM-23, GM-11 y GM-121) fueron efectivas para la reducción de las infecciones causadas por *R. solani*. Además, la cepa GM-23 se asoció con un incremento en la longitud de plántulas de chile. La respuesta de incremento del crecimiento de las plántulas puede estar asociada a la capacidad del organismo para sobrevivir y desarrollarse en la rizósfera y de que de alguna manera estas cepas benefician a la planta al promover un incremento en el crecimiento o un efecto de control biológico se les ha llamado PGPR (por sus siglas en inglés) o “rizobacterias promotoras del crecimiento” (Kloepper *et al.*, 1980).

Las cepas de *B. thuringensis* probadas en esta investigación fueron eficientes en ensayos de control *in vitro* de *R. solani* en plántulas de chile. Estos resultados son similares a los obtenidos por diversos autores los cuales empleaban principalmente bacterias y hongos (Ahmad *et al.*, 1999, Berger *et al.*, 1996, Silo-Suh *et al.*, 1994). Parece que la antibiosis es el principal modo de acción, y algunas evidencias apuntan en esa dirección (Lee *et al.*, 2003, Ligon *et al.*, 2000). Se requiere llevar a cabo experimentos adicionales para poder determinar los procesos bioquímicos y la actividad microbial involucradas en la capacidad antagonista de las distintas cepas de *B. thuringensis*.

8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos bajo las condiciones desarrolladas de esta investigación y considerando la discusión de la misma, se derivan las siguientes conclusiones y recomendaciones:

- De las plantas de chile analizadas provenientes de 44 diferentes localidades del estado de Durango se encontró la presencia de seis hongos previamente reportados local o globalmente como patogénicos al cultivo de chile. Los hongos más frecuentemente aislados de plantas de chile fueron *R. solani*, *Fusarium* spp. y *Verticillium* spp.
- La enfermedad de la “marchitez del chile” se encontró en todas las localidades muestreadas, independientemente de la ubicación geográfica de la parcela y tipo de chile sembrado.
- Los lotes de semilla de chile presentaron diferencias entre ellos en las pruebas de germinación estándar, germinación en charola bandeja speedling y envejecimiento acelerado.
- Independientemente de la asepsia y desinfección de las semillas de chile, los resultados de los análisis sanitarios de lotes de semillas probadas, demostraron la presencia de cuatro de los principales patógenos del cultivo

de Chile, *Alternaria* spp., *S. sclerotiorum*, *Fusarium* spp. y *R. solani*, así como de otros fitopatógenos. De manera general los hongos detectados en semilla de Chile no tuvieron influencia sobre el vigor y germinación de plántulas normales.

- De las 64 cepas de *B. thuringiensis* probadas, solo 16 redujeron de manera significativa el crecimiento micelial de *R. solani*, *P. capsici* y *F. oxysporum* en pruebas de antagonismo *in vitro*.
- Solo en el caso de las semillas tratadas con cepas de *B. thuringiensis*+*R. solani* se incrementó significativamente el porcentaje de germinación bajo condiciones *in vivo*.
- En la prueba de producción de antibióticos volátiles, todas las cepas de *B. thuringiensis* probadas mostraron un efecto inhibitorio en mayor o menor grado contra *R. solani*.
- Después del ensayo de filtrados y de termoestabilidad no se observaron evidencias de actividad antagónica de *B. thuringiensis* para el control de *R. solani*.
- Las plántulas de Chile tratadas con las cepas de *B. thuringiensis* antagonistas mostraron una reducción en la aparición de los signos y sintomatología provocados por *R. solani*.

- Las cepas GM-23, GM-11 y GM-121 de *B. thuringiensis* mostraron la máxima reducción de severidad de *R. solani* en las plántulas de Chile.
- Las cepas *B. thuringiensis* antagonistas además mostraron tener un efecto promotor del crecimiento de tallos y raíces en plántulas de Chile.

9. RECOMENDACIONES

El uso de controladores biológicos puede significar una disminución significativa en el uso de pesticidas y con ello una disminución en la contaminación de los alimentos y el deterioro del ambiente. La disminución del uso de los diferentes productos químicos que se utilizan para el control de la enfermedad conlleva a una reducción sustancial de los costos de la producción agrícola.

El uso de microorganismos en el control de enfermedades de vegetales ofrece un sinnúmero de posibilidades, lo cual estimula el establecimiento de trabajos de investigación tendientes a resolver esta. Es preciso, sin embargo, llevar estas investigaciones a ensayos bajo condiciones de campo. Dichas investigaciones deberán regirse por los siguientes premisas: lograr una selección adecuada de los organismos hiperparasitos o antagonicos más eficientes para cada una de las especies o líneas, diseño de estrategias en donde la alteración del ambiente resulte favorable para el hiperparasito o antagonista y al mismo tiempo no represente un riesgo para el cultivo; determinación del momento de aplicación óptimo de las sustancias antibióticas de manera que se logre su máximo aprovechamiento en los momentos críticos del ciclo de la enfermedad.

Es altamente recomendable realizar estudios sobre el impacto de agentes de control biológico en el ambiente además de un estricto control cualitativo de

productos formulados provenientes de agentes de control biológico naturales. Priorizar estudios a nivel de Biofilms, es decir el tipo de interacción de los microorganismos con las plantas y así determinar que microorganismos son benéficos para el ecosistema del suelo, ya que existen pocos trabajos al respecto y es ya un requisito en la legislación de muchos países.

Finalmente una vez seleccionados los microorganismos más eficaces es necesario buscar mediante estrategias de modificación genética, la forma de lograr una producción masiva y de una alta calidad de los metabolitos a usar en el control biológico.

LITERATURA CITADA

- Acea MJ, Moore CR, Alexander M. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20:509-515.
- Agarwal KV, Sinclair JB. 1987. Principles of Seed Pathology. CRC Ores Inc. Boca Raton, Florida. U.S.A. VI. pp. 83.
- Agrios NG. 1985. Fitopatología. 4a. edición. LIMUSA. México, D.F. 756 p.
- Ahmed AS, Sánchez CP, Egea E, Candela M. 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* 48:58-65.
- Ahmed AS, Sánchez CP, Egea E, Candela M. 1996. Evaluación de la inducción de resistencia de pimientos a *Phytophthora capsici* mediante el tratamiento con *Trichoderma harzianum*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Ainsworth GC. 1981. Introduction to the history of plant pathology. Cambridge Univ. Press. Cambridge. pp. 11-34.
- Alexopoulos CJ, Mims CW. 1979. Introductory Mycology. Ed. John Wiley and Sons Inc. 3rd ed. 639 p.
- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. Ed. John Wiley and Sons Inc. 4th ed. USA. 756 p.
- Álvarez ZR. 2003. El Biocontrol con *Trichoderma* y *Bacillus* como un factor del manejo integrado de la marchitez vascular del chile. Memorias del XXX Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. South Padre Island, Texas, USA. p. 102.
- Amaral A, Doss. 1983. Accelererated aging a test of seed vigor Lauoura Arrozeira 36. Brazil 343:24-25.
- Andrew CH. 1987. Vigor de la semilla. Curso de Tecnología de Semillas. CIAT. Cali, Colombia.
- Arcos CGJ, Hernández HDE, Uriza A, Pozo CO, Olivera AS. 1998. Tecnología para producir chile jalapeño en la planicie costera del golfo de México. INIFAP, SAGAR, México D.F. Folleto técnico No 24. pp. 206.

Arras G, Arru S. 1997. Mechanism of action of some microbial antagonists against fungal pathogens. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 47:97-120.

Asaka O, Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62:4081-4085.

Association of Official Seed Analysts (AOSA).1983. Seed Vigor Testing Handbook, Contribution, USA. No 32 to the Handbook on Seed Testing.

Ayvar SS, Sosa-Moss M, Rosas R, Villarreal GL. 1994. Compendio de enfermedades de algunos cultivos de México. Vol. 1. SARH. Serie Sanidad Vegetal. México, D F. 229 p.

Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science* 9:26-32.

Baker KF, Cook RJ. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman. San Francisco, CA, EEUU. pp. 432.

Baker KF. 1947. Seed transmission of *Rhizoctonia solani* in relation to control of seedling damping off. *Phytopathology* 37:912-924.

Barboza CJE, Contreras JC, Velásquez RR, Bautista JM, Gómez RM, Cruz CR, Ibarra JE. 1999. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters* 21:1125-1129.

Barea JM, Azcón R, Azcón AC. 2004. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. In: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp R, eds. *Plant surface microbiology*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. pp. 351-371.

Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JW, Jacobsen BJ. 2004. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control* 30:342-350.

Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JW, Jacobsen BJ. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological Molecular Plant Pathology* 61:289-298.

Barnett HL, Hunter BB. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect fungi*. 4th edition St. Paul. Mn APS Press. pp. 218.

Basha S, Ulaganathan K. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science* 82:1457-1463.

- Bashan Y, Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30:1225-1228.
- Baskin CC. 1987. Accelerated aging Test, ISTA Handbook of Vigour Test Methods. 2 ed, Zurich, Switzerland. pp.72.
- Bautista CJ, García ER, Pérez MJ, Zavaleta ME, Montes BR, Ferrera CR. 2008. Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *Interciencia* 33:96-102.
- Benizri E, Piutti S, Verger SP, Vercambre G, Poessel JL, Michelot P. 2005. Replant diseases: Bacterial community structure and diversity in peach rhizosphere as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1738-1746.
- Berger F, Li H, White D, Frazer R, Leifert C. 1996. Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses. *Phytopathology* 86:428-433.
- Bettiol W, Lazzaretti E. 1997. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agrícola* 54:89-96.
- Bizzarri MF, Bishop AH. 2007. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from the phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. *Journal Invertebrate Pathology* 94:38-47.
- Blaak H, Schnellmann J, Walter S, Henrissat B, Schrempf H. 1993. Characteristics of an exochinase from *Streptomyces olivaceoviridis*, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. *European Journal of Biochemistry* 214:659-669.
- Black LL, Green SK, Hartman GL, Poulos JM. 1991. Pepper Diseases. A field Guide. Asian vegetable research and development center. AVDRC Publication No. 91-347. Taipei, Taiwan. pp. 98.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biology* 4:343-350.
- Blumer C, Haas D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology* 173:170-177.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, United Kingdom.

- Bosland PW, Lindsey DL. 1991. A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Disease* 75:1048-1050.
- Bosland PW, Votava EJ. 1999. Peppers: vegetable and spice capsicums. London: CAB International.
- Brasil.1992. Ministério de agricultura e reforma agrária. Regras para análise de sementes. Brasília. pp. 365.
- Bustamente GL. 1997. Apuntes del Curso de tecnología de semilla TEC500 UAAAN, Saltillo Coah.
- Caliari MF, Marcos FJ. 1990. Comparação entre métodos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 12:52-75.
- Campos AJ. 1987. Enfermedades del frijol. Editorial Trillas. México, D.F. 132 p.
- Cano AMF. 1998. El cultivo del chile. Disponible en el sitio de red: <http://www.mflor.mx/materias/temas/cultivochiles/cultivochiles.htm> [Revisado en Mayo de 2008]
- Capper AL, Higgins KP. 1993. Application of *Pseudomonas fluorescens* isolates to wheat as potential biocontrol agents against takeall. *Plant Pathology* 42:560-567.
- Casarrubias U, Frías AG. 1992. Evaluación de la eficacia de *Bacillus subtilis* para el control de la marchitez del chile en condiciones de invernadero. pp. 165. *In: Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitopatología*. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Castilla N. 1995. Manejo del cultivo intensivo del tomate. En: Nuez, F. (Ed.). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. pp.189-226.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar NB, Bhatnagar R. 2004. Bacterial insecticidal toxins. *Critical Reviews in Microbiology* 30:33-54.
- Chávez JJ, Zavaleta ME, Téliz OD, Juárez PC. 1994. Control integrado de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) ocasionada por *Phytophthora capsici* en la region de Valsequillo, Puebla. *Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A.C. Cuernavaca, Morelos, México. p. 26.
- Chávez JJ, Zabaleta ME.; Teliz OD. 1995. Control integrado de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L) ocasionado por el hongo *Phytophthora capsici* en la región de Valsequillo, Puebla, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:47-55.

Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami HH, Daffonchio D. 2003a. Genetic relationship in the '*Bacillus cereus* group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *Journal Applied of Microbiology* 94:1108-1119.

Cherif A, Chehimi S, Limem F, Rokbani A, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, Boudabous A. 2003b. Purification and characterization of the novel bacteriocin entomocine 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9. *Journal Applied of Microbiology* 95:990-1000.

Chernin L, Ismailov Z, Haran S, Chet I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1720-1726.

Choi KC, Young C, An SH, Yook B. 1999. Effects of antagonistic bacteria and soil borne pathogenic fungi on growth of pasture plant seedlings. *Korean Journal of Dairy Science* 21:41-48.

Chowdhary S. 1957. Studies on development and control of fruit rot of chilies. *Indian Phytopathology* 10:55-52.

Christon TA. 1962. Penetration and hostparasite relationship of *R. solani* in the bean plant. *Phytopathology* 52:381-389.

Cobaquil GAR. 1991. Evaluación de modalidades para estimar vigor es semilla de maíz (*Zea mays* L.) mediante envejecimiento acelerado. Tesis. Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Coahuila, México. pp. 78.

Compant S, Duffy, B, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959.

CONAPROCH. 2006. Chiles. <http://www.conaproch.org/> [Revisado en Diciembre de 2007]

Cook RJ, Baker KF. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. pp. 539.

Copeland LO, McDonal MB. 1985. *Principies of seed Science and technology*, Burgess Publishing Company, USA.

Daffonchio D, Cherif A, Borin S. 2000. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers

describe genetic relationships in the “*Bacillus cereus* group”. Applied and Environmental Microbiology 66:5460-5468.

Dai XY, Guan GL. 1999. Study on two strains of antagonistic bacteria producing antagonistic proteins to *Phytophthora capsici*. Chinese Journal of Biological Control 15:81-84.

Dandurand LM, Knudsen GR. 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. Phytopathology 83:265-270.

Datar W. 1995. Pathogenicity and effect of temperature on six fungi causing fruit rot of chilli. IndiIndian- Journal- Of mycology and plant pathology 25(3) Dhawale S. D. And Kodmelwar R.V. 1978. Studies on Mycoflora of Chilli Seed. Seed Research 6:23-30.

De la Isla L. 1994. Fitopatología. 2^a Ed Editorial limusa. Mexico. pp. 9.

Delouche JC. 1973. The problem of vigor. Proc., Short Course. Seed Technology Laboratory Missisipi State, University. USA. pp. 19.

Delouche JC, Baskin CC. 1976. Accelerated Aging Techniques for Predisting. The Relative Storability of seed Lost. Seed Science and Technology 1:427-452.

Delouche JC, Cadwell WP. 1960. Seed vigor and vigor test, Proc, Assoc, Offic. Seed Anal. U.S.A. pp. 50:124-129.

Desai S, Reddy MS, Kloepper JW. 2002. Comprehensive Testing of Biocontrol Agents. En Gnanamanickam SS (Ed.) Biological Control of Crop Diseases. Dekker. New York, NY, EEUU. pp. 387-420.

Dhingra OD, Sinclair JB. 1987. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. pp. 355.

Di Pietro D, Gut MR, Pachlatko JP, Schwinn A. 1991. Role of antibiotics produced by *chaetomium globosom* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off. Phytopathology 82:131-135.

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A. 2001. Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Australian Journal of Plant Physiology 28:1-9.

Dobbelaere S, Vanderleyden, J, Okon Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22:107-149.

Dojoide SG. 1985. Onion Seed quality and relation to seed deterioration under accelerated aging condition. Seed Abstracts 10:1595.

- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002. Identification of quorum-quencing N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1754-1759.
- Duijff BJ, Gianinazzi PV, Lemanceau P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. *New Phytologist* 135:325-334.
- Durán-Ortiz LJ, Pérez-Moreno L, Sánchez-Pale, Olalde-Portugal V. 2001. Identificación de los hongos que ocasionan la “marchitez del chile” en la región del Bajío. *Memorias. XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología*. F-13.
- Elias SG, Copeland LO. 1997. Evaluation of Seed Vigor Test for Canola. *Seed Technology* 19:78-87.
- Ellis RH, Roberts EH, 1980. Hacia una base racional para evaluar la calidad de la semilla. En: Habbelhwaite, P.D. *Producción moderna de semillas escuela de agricultura*. Universidad de Nottingham. De. Hemisferio sur. Inglaterra. pp. 623-701.
- Emmert EAB, Handelsman J. 1999. Biocontrol of Plant Disease: A (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171:1-9.
- Emmert EAB, Klimowicz AK, Thomas MG, Handelsman J. 2004. Genetics of zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70:104-113.
- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora*. Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. pp. 145-184.
- Espinoza-López LL, Mendoza-Zamora C. 2001. Etiología, de la pudrición de raíz y cuello del chile el Valle del mezquital, México. XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. p. F-157. Querétaro, Qro.
- Espinosa UM. 2004. Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid* 52:139-150.
- Ezziyyani M, Requena ME, Egea GC, Candela ME. 2007. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology* 155:342-349.
- FAOSTAT 2007. Base de datos de estadísticas agrícolas. <http://faostat.fao.org/> (Revisado el 29 de noviembre del 2007).
- Faramarzi MA, Stagars M, Pensini E, Krebs W, Brandl H. 2004. Metal solubilization from metal-containing solid materials by cyanogenic *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Biotechnology* 113: 321-326.

- Felse PA, Panda T. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:141-151.
- Filgueiras TO. 1981. Seed vigor and productivity. *Pesquisa agropecuaria Braileira* 16:851-854.
- Firoved AM, Deretic V. 2003. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 185:1071-1081.
- Freeman S, Minzm O, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav-David D, Bilu A, Dag A, Shafir S, Elad Y. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110:361-370.
- Gabriel CJ, Cook RJ .1990. Biological control, the need for a new scientific framework. *Bioscience* 40:204-207.
- Gallagher LA, Manoil C. 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology* 183:6207-6214.
- Gallegos LM. 1978. enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa. CIAPAN. 123 p.
- Gamalero E, Lingua G, Capri FG, Fusconi A, Berta G, Lemanceau P. 2004. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiology Ecology* 48:7987.
- García ER. 2007. Control biológico y supresividad En Ferrera CR, Alarcón A (Eds.) *Microbiología Agrícola para el siglo XXI*. Trillas. México. pp. 328-341.
- García RS, Juárez C, Carrillo JA, Allende R, Marquéz I, Muy-Rangel MD. 2000. Marchitez Bacteriana en Chile Bell Causada por *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:120-124.
- Gil OR, Espanol CP, Zueco JC. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. *Plant Breeding* 107:50-55.
- Gindrat D .1979. Biocontrol of plant diseases by inoculation of fresh wounds, seeds. And soil with antagonists. En Schippers B, Gams W (Eds.) *Soil-Borne Plant Pathogens*. Academic Press. New York, NY, EEUU. pp. 537-551.
- Glare TR, O'Callaghan M. 2000. Characterisation. In: *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*, J. Wiley and Sons Ltd, West Sussex PO19 1UD, UK, pp. 71-79.

Glick BR. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251:1-7.

Goldberg NP. 1995. Chile Pepper Diseases. Agricultural Experiment Station, College of Agriculture and Home Economics, New Mexico State University. Circular 549. Las Cruces, New Mexico, USA. pp. 20.

González CMM, Torres I, Guevara R. 2001. 2º Informe de actividades del proyecto “Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz (*Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*) en colectas de Chile”.

González PE, Yáñez MM, Santiago SV, Montero P. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del Chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla.

Gormely JP. 1980. Determinación de la patogenicidad de dos cepas de *Rhizoctonia solani* en cuatro hospederos bajo condiciones de laboratorio durante la primavera, verano y otoño. Tesis I.T.E.S.M. Monterrey, N.L. México. 68 p.

Guerrero-Aguilar BZ, Sánchez-Delgadillo F, Guevara-Olvera L, Guevara-González RG, Torres -Pacheco I, González-Chavira MM. 2001. Caracterización de aislados mexicanos de *Rhizoctonia solani* (Kühn). XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. p. F-136. Querétaro, Qro.

Guerrero-Moreno A, Laborde JA. 1980. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. Synopses of the IVth Meeting of the Capsicum Working Group of Eucarpia. I.V.T., Wageningen, The Netherlands. P. 52-56.

Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling process. *Soil Biology and Biochemistry* 37:395-412.

Guigón LC, González PA. 2001. Estudio regional de las enfermedades del Chile (*capsicum annum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.

Haas D, Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3:307-319.

Handelsman J, Mester EH, Raffel S. 1988. Mechanism of biocontrol of *Phytophthora* by *Bacillus cereus* UW85. In: R. Palacios y D.P.S. Verna (eds.). Molecular genetics of plant-microbe interactions. A.P. St. Paul, Minn., USA. pp. 303-310.

Handelsman J, Nesmith WC, Raffel SJ. 1991. Microassay for biological and chemical control of infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Current Microbiology* 22:317-319.

- Handelsman J, Raffel S, Mester EH, Wunderlich L, Grau CR. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 56:713-718.
- Hee J, Jung YL, In SH., Bong SY, Beom SK, Byung, KH. 2006. Isolation and antifungal and antioomycete activities of staurosporine from *Streptomyces roseoflavus* strain LS-A24. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 54:3041–3046.
- Helbig J, Trierweiler B, Schulz FA, Tauscher B. 1998. Inhibition of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. and *Penicillium digitatum* Sacc. by *Bacillus* sp. (Isolate 17141) *in vitro*. *Journal of Plant Disease Protection* 105:8-16.
- Heredia ZA. 1966. Herencia de la Resistencia del Chile (*Capsicum annum L.*) al Ataque del Hongo *Phytophthora capsici* Leo. Tesis Profesional E.N.A. Chapingo, Mex. pp. 40.
- Hernández CS, Andrewa R, Ferré YBJ. 2005. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. *Journal Invertebrate Pathology* 88:8-16.
- Hilje L. 1997. Posibilidades para el manejo integrado del complejo *Bemisia tabaci* - Geminivirus en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21:139-142.
- Hoitink HAJ, Fahy P. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with compost. *Ann. Review Phytopathology* 24:93-114.
- Homma Y, Kato Z, Hirayama F, Konno K, Shirahama H, Suzui T. 1989. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biology and Biochemistry* 21:723-728.
- Hooker JW. 1990. *Compendium of potato diseases*. 4th. Ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, U S A. 125 p.
- Howell CR, Beier RC, Stipanovic RD. 1988. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology* 78:1075-1078.
- Huang CJ, Chen CY. 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. *Annals of Microbiology* 54:289-297.
- Huang CJ, Wang TK, Chung SC, Chen CY. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38:82-88.
- Huang JW, Sun SK. 1978. Factors affecting survival of watermelon wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* in soil. *Plant Protection Bulletin* 20:56-66.

Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux JP. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant Microbe Interaction* 16:851-858.

Il Kim P, Chung KC. 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters* 234:177-183.

International seed testing association. (ISTA) 1999. International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology* 27: supplement 333.

Internacional seed testing association. (ISTA) 1985. Rules for seed testing. 1985. *Seed Science and Technology* 13:299-520.

International seed testing association. (ISTA) 1981. Handbook of vigor test methods. Zurich Switzerland. pp. 56.

Isely D. 1950. The cold test for corn. *Proc in seed Test Association* 16:299-311.

Islam TM, Hashidoko Y, Deora A, Ito T, Tahara S. 2005. Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3786-3796.

Jacobsen BJ, Backman PA. 1993. Biological and cultural plant disease controls: Alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant Disease* 77:311-315.

Jacobsen BJ, Zidack NK, Larson BJ. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94:1272-1275.

James C. 2005. Preview: Global status of commercialized biotech/GM crops: 2004. ISAAA Briefs No. 32. ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications): Ithaca, NY.

Janisiewicz W. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest disease of apples. *Phytopathology* 86:473-479.

Jara CTV. 1993. Potencial de pruebas de vigor para el ensayo de semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Coahuila, México. pp. 119.

Jee HJ, Cho WD, Kim CH. *Phytophthora Diseases in Korea*. National Institute of Agricultural Science and Technology. 226 p.

- Jianhua Z, McDonald MB. 1996. The saturated salt accelerated aging test for smallseeded crops. *Seed Science and Technology* 25:123-131
- Jiménez DF. 1997. IX Curso Taller de Semillas. Memorias. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila México.
- Johnson RR, Wax LM. 1978. Relationship of soybean germination and vigor test to field performance. *Agronomy Journal* 70:273-278.
- Jung HK, Kim SD. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 32: 312-316.
- Jung HK, Kim SD. 2005. An antifungal antibiotic purified from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper Phytophthora-blight disease. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:1001-1010.
- Jung HK, Kim SD., 2003. Purification and characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papper Phytophthora blight disease. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 31:235–241.
- Kajimura Y, Sugiyama M, Kaneda M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *Journal of Antibiotics* 48:1095-1103.
- Kerr A. 1980. Biological control of crown gall through production of agrocin 84. *Plant Disease* 64:25-30.
- Kiely PD, Haynes JM, Higgins CH, Franks A, Mark GL, Morrissey JP, O’Gara F. 2006. Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbial Ecology* 51:257-266.
- Kim HY, Choi GJ, Lee HB., Lee SW, Lim HK, Jang, KS, Son SW, Lee SO, Chon KY, Sung ND, Kim JC., 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology* 44:332-337.
- Kim JY. 2003. Overproduction and secretion of *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (bglBC1) in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Biotechnology Letters* 25:1445-1449.
- Kloepper JW. 1997. Current Status and Future Trends in Biocontrol Research and Development in the U.S., In: International Symposium on Clean Agriculture, Sapporo: OECD, pp. 49-52.
- Kloepper JW, Ryn CM, Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* sp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

- Kloepper JW, Schroth MN, Miller TD. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.
- Kobayashi DY, Reedy RM, Bick JA, Oudemans PV. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1047-1054.
- Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Gabriele H, Franke P, Vater J, Borris R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186:1084-1096.
- Krebs B, Hoding B, Kubart S, Workie MA, Junge H, Schmiedeknecht G, Grosch R, Bochow H, Hevesi M. 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Disease Protection* 105:181-197.
- Krishanasamy V, Seshu DV. 1990. Germination after accelerated aging and associated character in rice varieties. *Seed Science and Technology* 18:147-157.
- Kui JL, Seralathan KK, Han SS, Cho KS, Gun WL. 2008. Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1139-1145.
- Laborde CJA, Pozo CO. 1984. Presente y pasado del chile en México. Publicación especial No. 85. INIA. México. pp 80.
- Larena I, Melgarejo P, De Cal A. 2002. Production, survival, and evaluation of solid-substrate inocula of *Penicillium oxalicum*, as a biocontrol agent against *Fusarium wilt* of tomato. *Phytopathology* 92:863-869.
- Leclere V, Bechet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet IM, Jacques P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4577-4584.
- Lee JY, Hwang BK, 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 48:407-417.
- Lee JY, Moon SS, Hwang BK. 2003a. Isolation and *in vitro* and *in vivo* activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *Pest Management Science* 59:872-882.

- Lee JY, Moon SS, Hwang BK, 2003b. Isolation and antifungal and antiomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology* 69:2023–2031.
- Lee JY, Moon SS, Hwang BK, 2003c. Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Volletoteichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *Pest Management Science* 59:872-882.
- Leeman M, Van Pelt JA, Den Ouden FM, Heinbroek M, Bakker PAHM. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to Fusarium wilt, using novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 101:655-664.
- Lefebvre V, Palloix A. 1995. Mapping QTL's affecting the resistance *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Genome III Conference*. Town & Country Conference Center, San Diego, CA.
- Lefebvre V, Palloix A. 1996. Both epistatic and additive effects of QLTs are involved in polygenic induced resistance to disease. A case study, the interaccion pepper – *Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and applied genetics* 93:503-511.
- Leon GH. 1982. Enfermedades de los cultivos en el estado de Sinaloa. *Boletín Técnico INIA-SARH*. México. 183 p.
- Leonian LH. 1922. Stem and fruit of pepper caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology* 12:401-408.
- Leveau JHJ, Lindow SE. 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2365-2371.
- Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, Torkewitz NR, Hofmann D, Kempf HJ, Van Pee KH. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* 56:688-695.
- Liu M, Cai QX, Liu HZ, Zhang BH, Yan JP, Yuan ZM. 2002. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology* 93: 374-379.
- Liu M, Wang J, Liu J, Yao JM, Yu ZL. 2006. Expression of *Bacillus subtilis* JA18 endo-beta-1,4-glucanase gene in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Annals of Microbiology* 56: 41-45.
- Liu,R, Lu ZJ, 2003. Inhibition of *Trichoderma harzianum* T2 against the soil-borne fungal diseases of capsicum. *Journal of Zhongkai Agrotechnical College* 16:6-11.

Lopes AC, Santos JRM. 1994. Doenças do tomateiro. Brasília: Embrapa-CNPq. pp 67.

López-Vásquez MA, González-Chavira MM, Torres-Pacheco I, Delgadillo-Sánchez F, Guevara-González RG. 2002. Patógenos involucrados en la pudrición de raíz del chile. XXIX Congreso Internacional de Fitopatología. p. F-155. Monterrey, N.L.

Lowell LB, Green K, Hartman L, Poulus J. 1993. Enfermedades del Chile, una guía de campo. Editorial Centroamericano de Investigación y Desarrollo Vegetal. Colombia. 98 p.

Lucca FOA. 1995. Curso de tecnologia de sementes. Brasília: ABEAS. pp 53.

Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 86:1-25.

Lugtenberg BJJ, de Weger LA, Bennett JW. 1991. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Current Opinion in Microbiology* 2:457-464.

Machado JC. 2000. Tratamento de sementes, no controle de doenças. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE. pp 138.

Mahaman BD, Passam, HC, Sideridis AB, Yialouris CP, Diaries I. 2003. A diagnostic advisory rule-based expert system for integrated pest management in *Solanaceae* crop systems. *Agricultural systems* 76:1119-1135.

Marcos FJ, Cícero SM, Silva WR. 1987. Avaliação da qualidade das sementes. Piracicaba: FEALQ. pp.230.

Martinson CA. 1965. Formation of infection suchions by *Rhizoctonia solani* an sintetic films in soil. *Phytopathology* 55:122-129.

Massago H, Yoshikawa M, Fukada N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. On medium for direct isolation of *Phytophthora* sp. From soils and plants. *Phytopathology* 67:425-428.

Mattehws S, Powell AA. 1981. Ensayo de deterioro Controlado en: Manuel de métodos de ensayos de vigor. Instituto Nacional de Semillas y Plantas de vivero. España. pp.39-45.

Maurhofer M, Hase C, Meuwly P, Metraux JP, Defago G. 1994. Induction of systemic resistance to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139-146.

- Mavingui P, Heulin T. 1994. *In vitro* chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. Soil Biology and Biochemistry 26:801-803.
- McDonald MB. 1977. The influence of seed moisture on the accelerated aging seed vigor test. Journal of seed Technology 2:12-28.
- McDonald MB. 1975. A Review and evaluation of seed vigor Test. Proc of Off. Seed national 65:117-122.
- McDonald MB, Copeland LO. 1997. Seed Production Principles and Practices. Chapman & Hall. New York. EUA.
- McGee D. 1998. Perspectivas de las enfermedades transmitidas por la semilla. Curso Internacional sobre Tecnología de Producción de Semillas de Maíz. CIMMYT, El Batán Edo de México. pp. 1-5.
- McKeen CD, Reilly CC, Pusey P. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. Phytopathology 76:136-139.
- Meadows MP, Ellis DJ, Butt J, Jarret P, Burges HD. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. Applied and Environmental Microbiology 58:1344-1350.
- Melhus EI, Kent GC. 1979. Elements of Plant Pathology. 4 th. Ed. McMillian Co. N.Y. U S A. 493 p.
- Mello VDC, Tillmann MAA. 1987. O teste de vigor em câmara de envelhecimento precoce. In: Congresso brasileiro de sementes, Gramado, Resumos... Brasília: ABRATES. pp. 85.
- Mendoza ZC, Pinto BC. 1983. Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Departamento de parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo de México. 311 p.
- Mercado, J, Bustamante E. 1993. Evaluación de resistencia de cultivares criollos de chile dulce (*Capsicum annuum*) a *Phytophthora capsici*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 27:5-10.
- Meziane H, Van der Sluis, I, Van Loon LC, Hofte M, Bakker PAHM. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Molecular Plant Pathology 6:177-185.
- Miranda F. 1984. Vigor y pruebas de vigor de semillas Conferencia VIII Curso de Postgrado en Tecnología de semillas. CIAT, Colombia. pp 18.

- Miranda ZFS. 1987. Avaliação da qualidade de sementes de berinjela (*Solanum melongena* L.). Pelotas. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas. pp.46.
- Miyaniishi N, Matsubara Y, Hamada N, Kobayashi T, Imada C, Watanabe E. 2003. The action modes of an extracellular β -1,3-glucanase isolated from *Bacillus clausii* NM-1 on β -1,3-glucooligosaccharides. *Journal Bioscience and Bioengineering* 96:32-37.
- Montealegre RJ, Reyes R, Pérez ML, Herrera R, Silva P, Besoain X. 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6:115-127
- Montes FC, Martínez GA. 1990. Producción de semilla de chile serrano. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México (Eds) J.
- Morales VA, Redondo JG, Covarruvias PEJ, Cárdenas SE. 2002. Detección y localización de *Phytophthora capsici*. En semilla de chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:94-97.
- Moreno ME. 1984. Análisis físico, biológico de semillas en la agricultura. UNAM-Instituto de Biología. México. pp. 383.
- Morgan FL. 1963. Infection inhibition and germ-tube lysis of three cereal rusts by *Bacillus pumilus*. *Journal of Bacteriology* 53:1346-1348.
- Morrissey JP, Walsh UF, O'Donnell A, Moeñne-Loccoz Y, O'Gara F. 2002. Exploitation of genetically modified inoculants for industrial ecology applications. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81:599-606.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90:622-629.
- Mridha MAU, Siddique ABM. 1989. Fruit rot disease of Chilli in Relation to Seed Infection. *Seed Research* 17:174-177.
- Nair JR, Narasimman G, Sekar V. 2004. Cloning and partial characterization of zwittermicin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1. *Journal of Applied Microbiology* 97:495-503.
- Nava A, Ochoa F, Trujillo G, Geraud F, Hernández L, Lastra R, Rivas G. 1996. Detección de virus en zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela. I. Estados Aragua y Zulia. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 13:285-292.

- Nava A, Trujillo G, Chirinos D, Rivero G. 1998. Detección de virus en las zonas productoras de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Venezuela IV. Estado Zulia. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 15:135-141.
- Neergaard P. 1977. Seed Pathology, Vol. 1 and 2, Mc millan, London.pp. 1187.
- Neergaard P. 1979. Seed Pathology. London: McMillan Press. pp. 839.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. pp. 190.
- Nemec S, Datnoff LE, Strandberg J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. Crop Protection 15:735-742.
- Nuti MP. 1994. European community regulation for the use and release of genetically modified organisms (GMOs) in the environment. In: O'Gara F, Dowling DN, Boesten B, eds. Molecular ecology of rhizosphere micro-organisms biotechnology and therelease of GMOs. Weinheim, Germany: VCH. pp.165-173.
- Ongena M, Duby F, Rossignol F, Fouconnier ML, Dommes J, Thonart P. 2004. Stimulation of the lipoxygenase pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a nonpathogenic *Pseudomonas* strain. Molecular Plant Microbe Interaction 17:1009-1018.
- Osburn RM, Milner JL, Oplinger ES, Smith RS, Handelsman J. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. Plant Disease 79:551-556.
- Pal KK, McSpadden GB. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Papavizas GC. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. Phytopathology 71:121-125.
- Parra G, Ristaino J. 2001. Resistance to Mefenoxam and Metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora Blight of bell pepper. Plant Disease 85:1069-1075.
- Paul, D, Sarma Y. 2006. Antagonistic effects of metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strains on the different growth phases of *Phytophthora capsici*, foot rot pathogen of black pepper (*Piper nigrum* L.). Archives of Phytopathology and Plant Protection 39:311-314.
- Paulitz TC, Belanger RR. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39:103-133.

- Peretti A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Editorial Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires. Argentina.
- Pérez ML, Durán OLJ, Ramírez MR, Sánchez PJR, Olalde PV. 2004. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a funguicidas. Memorias Primera Convención Mundial del Chile. León, Guanajuato, México. Resumen, pp. 144-150.
- Pérez ML, Durán OL, Ramírez MR, Sánchez PJR, Olalde PV. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. Revista Mexicana de Fitopatología 21:19-25.
- Pérez ML, Medina LO, Salinas GJG. 1990. Control genético y químico de la marchitez del chile *Capsicum annum* L. causada por *Phytophthora capsici* Leo. En la región de Irapuato, Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología 8:71-76.
- Perry. 1987. Introduction; Methodology and application of vigour Test: Growth and Evaluation test: Topographical Tetrazolium test: ISTA Handbook of vigour test methods, 2 ed Zurich, Switzerland. pp 2.
- Perry. 1980. El concepto de vigor de la semilla y su relevancia en las técnicas de producción moderna de semilla. Escuela de Nottingham, Editorial Hemisferio Sur Uruguay. pp. 693-701.
- Persello CF, Nussaume L, Robaglia C. 2003. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. Plant Cell and Environment 26:189-199.
- Pitt J, Hocking A. 1985. Fungi and Food spoilage. Academic Press. Sidney, Australia. pp 413.
- Pleban S, Chernin L, Chet I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology 25:284-288.
- Pozo CO. 2004. Importancia económico-social y cultural del chile. En: Curso-Taller Producción y Manejo Integral del Cultivo del Chile. Folleto Técnico No.2. CONAPROCH. Tampico, Tamaulipas, México. pp. 68.
- Press CM, Loper JE, Kloepper JW. 2001. Role of iron in rhizobacteria mediated induced systemic resistance of cucumber. Phytopathology 91:593-598.
- Qiu SX, He H, Ruan HC, Guan X, Hu FP. 2004. Biological control of pepper *Phytophthora* blight by endophytic TB2 (*Bacillus* sp.). Acta Phytopathologica Sinica 34:173-179.
- Raddadi N, Cherif A, Mora D, Brusetti L, Borin S, Boudabous A, Daffonchio D. 2005. The autolytic phenotype of the *Bacillus cereus* group. Journal of Applied Microbiology 99:1070-1081.

- Raddadi N, Cherif A, Mora D, Ouzari H, Boudabous A, Molinari F, Daffonchio D. 2004. The autolytic phenotype of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology* 97:158-168.
- Raffel SJ, Stabb EV, Milner JL, Handelsman J. 1996. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 142:3425-3436.
- Ramette A, Frapolli M, Defago G, Moenne LY. 2003. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant Microbe Interaction* 16:525-535.
- Raupach GS, Kloepper JW. 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158-1164.
- Redondo E. 1974. Estudio preliminar en la obtención de posibles plantas diferenciales para agrupar las razas patogénicas del hongo *Phytophthora capsici* Leonian. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Agricultura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Reyes RA, Escudero ABI, Aguilar UG, Hayward JPM, Barboza CJE. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *Journal of Food Science* 69:131-134.
- Rico-Guerrero L, Guerrero-Aguilar BZ, López-Vazquez A, Muñoz-Sánchez CI, Guevara-Olvera L, Guevara-González RG., Torres-Pacheco I, González-Chavira MM. 2001. Búsqueda de resistencia natural en plantas de Chile (*Capsicum* spp.) contra aislados del complejo fúngico que causa pudrición de raíz. XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. p. F-134. Querétaro, Qro.
- Rincón VJF, Velásquez VR. 1999. Reacción de genotipos de Chile (*Capsicum annuum* L.) a pudriciones radicales en Zacatecas. *Horticultura Mexicana* 7:130.
- Roberts AD, Boothroyd CW. 1978. *Fundamentos de patología vegetal*. Editorial Acirbia. Zaragoza España. 392 p.
- Roberts EH. 1972. *Viability of Seeds*. Londres: Chapman and Hall. pp. 448.
- Romero CS. 1988. *Hongos Fitopatógenos*. UACH. Chapingo, Edo. de México, México. 347 p.
- Rothballer M, Schmid M, Hartmann A. 2003. In situ localization and PGPR-effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis* 34:261-279.

- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Pare PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1017-1026.
- Sabry SA .1992. Microbial degradation of Shrimp-shell waste. *Journal Basic Microbiology* 32:107-11.
- SAGAR. 1996. Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos 1996. tomo II. Secretaria de agricultura ganadería y desarrollo rural, Centro de Estadística Agropecuaria. pp. 382-388.
- Sahin F, Cakmakci R, Kantar F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil* 265:123-129.
- Sanchez SJL. 1994. Pruebas de estrés para evaluar vigor en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) Universidad Autónoma Antonio Narro, Buenavista, Coahuila, México. pp. 65.
- Sandra AI, Wright CH, Zumoff LS, Steven VB. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 67:282-292.
- Sayers R. 1982. Pruebas de germinación y vigor. Memorias del curso de actualización sobre tecnología de semillas. UAAAN-AMSAC. pp. 129-136. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Schippers B, Bakker AW, Baker PAHM. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere organisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25:339-358.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:775-806.
- Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F. 1992. Isolation of 2,4-Diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology* 58:353-358.
- Shang H, Chen J, Handelsman J, Goodman RM. 1999. Behavior of *Pythium torulosum* zoospores during their interaction with tobacco roots and *Bacillus cereus*. *Curret Microbiology* 38:199-204.
- Sharga BM, Lyon GD. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44:777-783.

Sharifi TA, Zala M, Natsch A, Moenne LY, Défago G. 1998. Biocontrol of soilborne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology* 104:631-643.

Shwartz FH, Galvez EG. 1980. Problemas de producción de frijol, enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas. CIAT. 76 p.

Shoji J. 1978. Recent chemical studies on peptide antibiotics from the genus *Bacillus*. *Advances in Applied Microbiology* 24:187-214.

Siala A. Gray TR. 1974. Growth of *Bacillus substilis* and spore germination in soil observed by a fluorescent-antibody technique. *Journal of General Microbiology* 81:191-198.

Siddiqui MR, Sing D, Gaur A. 1977. Prevalence of chilli anthracnose Fungus on Seeds and Its Effective Control. *Seed Research* 5:67-72.

SHIGO. 2000. Foros de Planeación 2000. Cuaderno de Trabajo. Temática de Alimentos y Recursos Naturales. Morelia, Mich. México.

Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J, Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2023-2030.

Silo-Suh LA, Stabb EV, Raffel SJ, Handelsman J. 1998. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current Microbiology* 37:6-11.

Slabospitskaia AT, Krymovskaia SS. 1992. The chitinases of aerobic sporulating bacteria isolated from different ecological sources. *Mikrobiol Zh* 54:16-22.

Smirnov VV, Reznik SR, Vasilievskaya IA. 1986. Aerobe Endospore-forming Bacteria. Budapest: Medicina KoÉnyvkiadoÂ (in Hungarian).

Smith KP, Havey MJ, Handelsman J. 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Disease* 77:139-142.

Smith, PG, Kimble RG, Grogan Millet AH. 1967. Resistace of Strains of California Wonder Pepper to *Phytophthora* root rot. *Plant Disease Report* 35:509.

Smith RP, Havey MJ, Handelsman J. 1993. Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Disease* 77:139-142.

Sneh BL, Ogoshi. A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The phytopathological society (APS PREES) St. Paul Minnesota, USA. pp.133.

- Stabb EV, Handelsman J. 1998. Genetic analysis of zwittermicin A resistance in *Escherichia coli*: effects on membrane potential and RNA polymerase. *Molecular Microbiology* 27:311-322.
- Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D., Bryden WLLW, Burgess. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. 1st Ed. APS Press. Saint Paul, Minnesota.
- Suslow TV, Schroth MN. 1982. Rhizobacteria in sugar beets: Effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* 72:199-206.
- Takayanagi T, Ajisaka K, Takiguchi Y, Shimahara K. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochimica et Biophysica Acta* 1078:404-410.
- Takegawa K, Mikami B, Iwahara S, Morita Y, Yamamoto K, Tachikura T. 1991. Complete amino acid sequence of endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Flavobacterium* sp. *European Journal of Biochemistry* 2002:175-180.
- Tamietti G, Nervo e DG, Valentino. 1998. Genetic improvement of pepper for the resistance to *Phytophthora capsici* Leon.: status and perspectives. *Journal of Plant Pathology* 80:264.
- Tang XJ, He GQ, Chen QH, Zhang XY, Ali MAM. 2004. Medium optimization for the production of thermal stable dglucanase by *Bacillus subtilis* ZJF-1A5 using response surface methodology. *Bioresour Technology* 93:175-181.
- Tao TK. 1979. An evaluation of alternative methods of accelerated aging seed vigor test for soybeans. *Journal of Seed Technology* 3:30-49.
- Tehrani AS, Disfani FA, Hedjaroud GA, Mohammadi M. 2001. Antagonistic effects of several bacteria on *Verticillium dahliae* the causal agent of cotton wilt. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwk Toegep Biol Wet* 66:95-101.
- Thabuis A, Lefebvre V, Daubèze AM, Signoret P, Phaly T, Nemouchi G, Blattes A, Palloix A. 2001. Introgression of a partial resistance to *phytophthora capsici* leon. Into a pepper elite line by marker assisted backcrosses. *Acta Horticulturae* 546:645-650.
- Theis T, Stahl U. 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Science* 61:437-455.
- Thomashow LS, Weller DM, Bonsall RF, Pierson LS. 1990. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent pseudomonas in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 56:908-912.
- Tsao PH, Guy SO. 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora*-isolation medium containing hymexazol. *Phytopathology* 67:796-801.

- Tsujibo H, Minoura K, Miyamoto K, Endo H, Moriwaki M, Inamori Y. 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Applied and Environmental Microbiology* 59:620-622.
- Tsujibo H, Yoshida Y, Miyamoto K, Imada C, Okami Y, Inamori Y. 1992. Purification, properties, and Partial amino acid sequence of chitinase from a marine *Alteromonas* sp. Strain O-7. *Canadian Journal of Microbiology* 38:891-897.
- US Congress Office of Technology Assessment. 1995. Biologically-based technologies for pest control. OTA-ENV-636. US Government Printing Office, Washington, DC.
- Utkhede RS. 1984. Antagonism of isolates of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. *Canadian Botany* 62:1032-1035.
- Van Loon LC, Bakker PAHM. 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Dordrecht, The Netherlands: Springer Science. pp. 39-66.
- Van Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Van Loon LC, Bakker PAHM. 2003. Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In H. De Kroon & E. J. W. Visser (Eds.), *Root ecology*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. *Ecological studies* 168:297-330.
- Van Peer R, Niemann GJ, Schippers B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81:728-734.
- Van Peer R, Schippers B. 1992. Lipopolysaccharides of plant-growth promoting *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to Fusarium wilt. *Neth. Journal of Plant Pathology* 98:129-139.
- Van Wees SCM, Pieterse CMJ, Trijssenaar A, Van't Westende Y, Hartog F. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant Microbe Interaction* 10:716-724.
- Vázquez RJM. 1990. La bioquímica como herramienta para el estudio de la germinación. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas en México(Eds) Molina MJ, Estrada JA, Livera G.M, González H VA. *Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. (SOMEFI) Chapingo, México*. pp.189-202.
- Velásquez VR. 1991. Diagnóstico fitopatológico del cultivo de chile en Zacatecas. *Resúmenes de Investigación 1989*. SARH, INIFAP, CIFAP-ZACATECAS. *Publicación Especial No. 6*. Calera de V.R., Zacatecas, México. pp. 153.

- Velásquez VR, Medina AMM, Luna RJJ. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181.
- Velásquez VR, Medina AMM. 2003. La pudrición de la raíz de chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte-centro de México. I. Estudios básicos. Folleto Científico No. 14. Campo Experimental Pabellón, CIRNOC - INIFAP. Aguascalientes, Ags. 26 p.
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255:571-586.
- Vidhyasekaran, Thiagarajan. 1981. Seed-borne transmission of *Fusarium oxysporum* in chili. *Indian Phytopathology* 34:211-213.
- Villapudua JR. 1977. Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de "Marchitez del chile" Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 64.
- Walke SJ, Bosland PW. 1999. Inheritance of Phytophthora Root Rot and Foliar Blight Resistance in Pepper J. AMER. SOC. HORT. SCI. 124(1):14-18.
- Walker JC. 1952. Diseases of Vegetable Crops. McGraw-Hill Co. U S A. 529 p.
- Walker R, Powell AA, Seddon B. 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *Journal of Applied Microbiology* 84: 791-801.
- Wang YR, YU L, Nan ZB. 1996. Use of seed vigour tests to predict field emergence of Lucerne (*Medicago sativa*). *New Zealand Journal of Agricultural Research* 39:255-262.
- Watanabe T, Oyanagi W, Suzuki K, Tanaka H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *Journal of Bacteriology* 172:401-422.
- Weber GF. 1932. Blight of peppers in florida caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 2:775-780.
- Weller DM. 1988. Biological control of soilborne pathogens in the rizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 73:1548-1553.
- Weller DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rizosphere with bacteria. *Phytopathology* 26:379-407.
- Wilhite SE, Lunsden RD, Strancy DC. 2001. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5055-5062.

Virgen CG. 1990. Control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* con *Bacillus subtilis* en sandía bajo condiciones de campo. Tesis Maestría. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah. México.

Yáñez JMA. 1997. Manejo de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo), agallamiento radical (*Nacobbus aberrans* Thorne y Allen) y virosis del chile (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger WT. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81:97-168.

Zavaleta ME (2000). Alternativa de manejo de las enfermedades de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 17:201:207.

Zhao C, Luo Y, Song C, Liu Z, Chen S, Yu Z, Sun M. 2007. Identification of three zwittermicin A biosynthesis-related genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain YBT-1520. *Archives of Microbiology* 187:313-319.

Zhu ZY, Zhou, XG, Song RH, Lu JP, Wang SJ. 1995. *Capsicum* Phytophthora Blight with Biological-“fangyi-I”. *Acta Agriculture* 11:64-68.

APÉNDICE

Tabla I. Análisis de varianza de la variable respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	15	31988.4375	2132.5625	643.7925	0.000
Error	48	159.0000	3.3125		
Total	63	32147.4375			

C.V = 2.52 %

Tabla II. Análisis de varianza factorial y significancia de la variable respuesta de germinación estándar en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.).

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Factor A	5	123.906250	8.260417	2.7792	0.001
Factor B	2	68937.796875	34468.898438	11597.0117	0.000
Interacción	30	65388.218750	2179.607178	733.3257	0.000
Error	144	428.0000	2.972222		
Total	191	134877.921875			

C.V = 5.21%

Tabla III. Análisis de varianza de la variable de respuesta de germinación en charola “bandeja speedling” en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.).

FV	GL	SC	CM	F	P\F
Tratamiento	15	34007.000	2267.133301	745.3589	0.000
Error	48	146.000	3.041667		
Total	63	34153.000			

C.V = 2.30%

Tabla IV. Análisis de varianza de la respuesta de envejecimiento acelerado en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.).

FV	GL	SC	CM	F	P\F
Tratamiento	15	20875.734375	1391.715576	343.0159	0.000
Error	48	194.750000	4.057292		
Total	63	21070.484375			

C.V = 4.83%

Tabla V. Análisis de varianza factorial y significancia de la variable de respuesta de germinación con envejecimiento acelerado en lotes de semilla de chile (*Capsicum annuum* L.).

FV	GL	SC	CM	F	P)F
Factor A	15	12532.984375	835.532288	189.2515	0.000
Factor B	2	42289.328125	21144.664063	4789.3540	0.000
Interacción	30	26867.187500	895.572937	202.8510	0.000
Error	144	635.750000	4.414930		
Total	191	82325.250000			

