

Bacillus* spp. in the Control of Wilt Caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense

Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense

Miguel Ángel Mejía-Bautista, Arturo Reyes-Ramírez*, Jairo Cristóbal-Alejo, José María Tun-Suárez, Lizette del Carmen Borges-Gómez, Instituto Tecnológico de Conkal, km 16.3, Avenida Tecnológico s/n, CP. 97345 Conkal, Yucatán. México. Teléfono: (999) 9124135; Juan Ramiro Pacheco-Aguilar, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. Cerro de las campanas s/n, Colonia las Campanas, 76010. Querétaro, Querétaro. Teléfono: 01 (442) 192-1200 Extensión: 5531; Fax: 01 (442) 192-1304. *Autor para correspondencia (areyes.itconkal@gmail.com)

Recibido: 17 de Marzo, 2016

Aceptado: 15 de Junio, 2016

Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC y Pacheco-Aguilar JR. 2016. *Bacillus* spp. in the Control of Wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología 34:208-222.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1603-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1)

Primera publicación DOI: 20 de Junio, 2016

Firts DOI publication: June 20, 2015.

Resumen. El género *Fusarium* es un patógeno asociado al marchitamiento del chile y con reducción del rendimiento del cultivo. Las rizobacterias son una alternativa para mejorar la producción agrícola y protección contra fitopatógenos. En el presente estudio se evaluó el antagonismo *in vitro* de diez cepas de *Bacillus* contra *Fusarium equiseti* ITCF1 y *F. solani* ITCF2, todas las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento micelial entre 21.28 y 71.70 %, adicionalmente las cepas CBMT2 y CBMT51 presentaron halos de inhibición contra

Abstract. The genus *Fusarium* is a pathogen associated with chili wilt and reduced crop yield. Rhizobacterias are an alternative to improve agricultural production and protection against plant pathogens. In this work the *in vitro* antagonism of ten *Bacillus* strains against *Fusarium solani* ITCF1 and *F. equiseti* ITCF2 were evaluated. Our results showed that all the bacterial strains inhibited mycelial growth between 21.28 and 71.70 %, additionally the CBMT2 and CBMT51 strains showed inhibition halos against *F. equiseti* with halos of 3.76 and 6.37 mm. The two pathogens showed 100 % incidence of disease in seedlings habanero chili and severity of 90.0 % by *F. solani* and 77.5 % by *F. equiseti*. In resistance tests wilt four strains of *Bacillus* based on the antagonistic activity were used, three inoculations were made in base of stem 15, 28 and 35 days after germination, we found that *B. subtilis* CBMT51 and *B. cereus* BL18 reduced the severity disease caused by *F. equiseti* and BL18 strain for *F. solani*, in 47.7, 37.8 and 50.9 % respectively at 28 days of evaluation.

F. equiseti con halos de 3.76 y 6.37 mm. Los dos patógenos mostraron 100 % de incidencia de la enfermedad en plántulas de chile habanero y severidad de 90.0 % por *F. solani* y 77.5 % por *F. equiseti*. En pruebas de resistencia a la marchitez se utilizaron cuatro cepas de *Bacillus* con base en la actividad antagónica mostrada, se realizaron tres inoculaciones en la base del tallo a los 15, 28 y 35 días después de la germinación, se obtuvo que *B. subtilis* CBMT51 y *B. cereus* BL18 redujeron la severidad de la enfermedad ocasionada por *F. equiseti* y la cepa BL18 para *F. solani*, en un 47.7, 37.8 y 50.9 % respectivamente a los 28 días de la evaluación.

Palabras clave adicionales: Rizobacteria, antagonismo, incidencia, severidad, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*.

En México los estados con mayor superficie de producción de *Capsicum chinense* Jacq. son Yucatán, Tabasco, Campeche y Quintana Roo, siendo Yucatán la entidad federativa con más superficie de producción con 170 hectáreas y una producción de 1,826 toneladas (SIAP, 2013). Además debido a sus características organolépticas, de mayor vida de anaquel y picor el chile habanero producido en la Península de Yucatán se considera de calidad superior a los cultivados en otras partes del mundo (Medina *et al.*, 2008). La reducción del rendimiento del cultivo de chile está asociada a la presencia de fitopatógenos. El género *Fusarium* es uno de los fitopatógenos más importantes asociados al marchitamiento y a la reducción del rendimiento de chile. *Fusarium* spp. y *F. oxysporum* fueron los hongos con mayor frecuencia asociados a marchitez en un 100 % de muestras de *Capsicum annuum* L. de diferentes tipos de chile como serrano y jalapeño (Albañil *et al.*, 2015). En *C. annuum* L., se

Additional keywords: Rhizobacteria, antagonism, incidence, severity, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*.

In Mexico, the states with the highest surface dedicated to the production of *Capsicum chinense* Jacq. are Yucatán, Tabasco, Campeche, and Quintana Roo, Yucatán being the state with the greatest surface of production, with 170 hectáreas, and a production of 1,826 tons (SIAP, 2013). Also, due to its organoleptic characteristics of a longer shelf life and spiciness, the habanero chili produced in the Yucatan is considered of a higher quality than those grown in other areas of the world (Medina *et al.*, 2008). The reduction of the chili crop yield is related to the presence of plant pathogens. The genus *Fusarium* is one of the most important plant pathogens related to the wilting and yield reduction of the chili plant. *Fusarium* spp. and *F. oxysporum* were the most frequent fungi related to wilting in 100 % of *Capsicum annuum* L. samples of different types of chilies, such as serrano and jalapeño (Albañil *et al.*, 2015). In *C. annuum* L., *F. oxysporum*, *F. solani*, and *F. equiseti* have been identified to affect the crop and reducing yield significantly (Martínez *et al.*, 2011). The most common methods of control of these pathogens is the use of synthetic fungicides that pollute the environment. Therefore, an alternative for biological control is the use of antagonistic rhizobacterias, capable of exerting control over pathogens (Guillén *et al.*, 2006). This antagonism is attributed in part to the production of chitinases (Chang *et al.*, 2010) and lipopeptides such as: iturin, surfactin, fengycin, and bacillomycin (Ramarathnam *et al.*, 2007). The most commonly used rhizobacterias belong to the genus *Bacillus*. The species of *B. megaterium* and *B. licheniformis* not only promote growth and

han identificado *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. equiseti* afectando al cultivo y reduciendo significativamente el rendimiento (Martínez *et al.*, 2011). El método de control más común de estos patógenos es el uso de fungicidas sintéticos que contaminan el ambiente. Por ello una alternativa de control biológico es el empleo de rizobacterias antagonistas, capaces de ejercer un control de patógenos (Guillén *et al.*, 2006). Este antagonismo se atribuye en parte a la producción de quitinasas (Chang *et al.*, 2010) y lipopéptidos como: iturina, surfactina, fengicina y bacilomicina (Ramarathnam *et al.*, 2007). Las rizobacterias más utilizadas son del género *Bacillus*. Las especies de *B. megaterium* y *B. licheniformis*, además de promover el crecimiento e inducir un mayor rendimiento de *C. annuum* L., están relacionadas con la reducción de la incidencia de fitopatógenos (Amaresan *et al.*, 2014). La aplicación de *B. megaterium* en *C. annuum* infectadas con *Phytophthora capsici* Leonian redujo la severidad de la enfermedad en un 50.4 % (Akgül y Mirik, 2008). Las rizobacterias activan mecanismos de defensa de las plantas contra fitopatógenos (Ahemad y Khan, 2011). En rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal, se ha observado la reducción de algunas enfermedades en las plantas, y están relacionadas con la capacidad de inducir enzimas de defensa, como peroxidasa, polifenol oxidasa, fenilalanina amonio liasa, quitinasas y β -1,3 glucanasa, que pueden tener efecto en la reducción de la incidencia y severidad de las enfermedades (Saravanakumar *et al.*, 2007). Guillén *et al.* (2006), aplicaron *B. amyloliquefaciens* B1, *B. licheniformis* B3, y *B. subtilis* B9 y B13 sobre *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *P. capsici* Leonian, patógenos causantes de pudriciones de raíz de chile (*C. annuum* L.); la aplicación de las bacterias redujo la incidencia en 80 % y severidad de pudrición de raíz en 39 % respecto al testigo. En este estudio se evaluaron cepas de *Bacillus* spp. con actividad antifúngica *in vitro* y su efecto en la respuesta de

induce a higher yield of *C. annuum* L., but are also related to the reduction of the incidence of plant pathogens (Amaresan *et al.*, 2014). Applying *B. megaterium* in *C. annuum* infected with *Phytophthora capsici* Leonian reduced the severity of the disease by 50.4 % (Akgül and Mirik, 2008). The rhizobacterias activate defense mechanisms in plants against pathogens (Ahemad and Khan, 2011). In rhizobacterias that promote plant growth, a reduction has been observed of some diseases in plants, and they are related to the capacity of inducing defense enzymes, such asperoxidases, polyphenol oxidase, phenylalanin amonia lyase, chitinases and β -1,3 glucanase, which can have an effect on the reduction of disease incidence and severity (Saravanakumar *et al.*, 2007). Guillén *et al.* (2006), applied *Bacillus amyloliquefaciens* B1, *B. licheniformis* B3, and *B. subtilis* B9 and B13 on *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn and *P. capsici* Leonian, pathogens that cause rotting of roots in chili plants (*C. annuum* L.); applying bacteria reduced the incidence by 80 %, and root rotting severity by 39 % in comparison to the control. This study evaluated strains of *Bacillus* spp. with antifungal activity *in vitro* and its effect on the response of resistance to wilting in *C. chinense*, induced by *F. equiseti* and *F. solani*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms used and preparation of inoculants.

Ten strains were used of *Bacillus*, isolated, and characterized in earlier works, nine strains with activity *in vitro* against different pathogenic fungi (Sosa *et al.*, 2012; Mejía *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2016) and one strain (*Bacillus cereus* BL18) reported with properties in the growth enhancement

resistencia a la marchitez en *C. chinense*, inducida por *F. equiseti* y *F. solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados y preparación de inóculos.

Se utilizaron 10 cepas de *Bacillus*, aisladas y caracterizadas en trabajos previos, nueve cepas con actividad *in vitro* contra diferentes hongos fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2012; Mejía *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2016) y una cepa (*B. cereus* BL18) reportada con propiedades en la promoción de crecimiento en *C. annuum* L. (Peña *et al.*, 2016). Los inóculos bacterianos se obtuvieron de cultivos en caldo nutritivo® (CN), de siete días en agitación a 200 rpm a 29 °C, el tiempo utilizado fue para permitir la formación de esporas, lo cual fue verificado con ayuda de un microscopio óptico. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 8,000 x g por 10 min, al paquete celular se le realizó un lavado con solución 0.9 % de NaCl, y se ajustó a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ con la ayuda de una cámara de Neubauer (Luna *et al.*, 2013). Las cepas de *Fusarium solani* y *F. equiseti* fueron previamente aisladas de *C. chinense*. Los fitopatógenos fueron reactivados en medio de agar de papa dextrosa (PDA). Para su multiplicación se usaron hojuelas de avena esterilizadas en autoclave; para ello se depositaron 100 g de hojuelas en matraces de 250 mL de capacidad y se adicionó 40 mL de extracto de papa (300 g de papa cruda en 1 L de agua hirviendo por 15 min), posteriormente se depositaron dos discos de 0.5 cm del micelio en crecimiento activo de cada hongo fitopatógeno y fueron incubados en cámara de cultivo a 30 °C durante diez días (Bruna, 1991), esto se utilizó como inóculo para pruebas posteriores.

Inhibición de crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium* spp. por *Bacillus* spp.

in *Capsicum annuum* L. (Peña *et al.*, 2016). The bacterial inoculants were obtained from broths in a nutrient broth® (CN) stirred for seven days at 200 rpm at 29 °C. The time used was to allow the formation of spores, which was verified with a light microscope. Later, samples were centrifuged at 8,000 x g for 10 min; the cellular package was washed with a 0.9 % NaCl solution, and adjusted to a concentration of 1×10^8 UFC mL⁻¹ using a Neubauer camera (Luna *et al.*, 2013). *Fusarium solani* and *F. equiseti* strains were previously isolated from *C. chinense*. The pathogens were reactivated in a potato dextrose agar (PDA) medium. For their multiplication, we used oat flakes sterilized in autoclave; for this, 100 g of flakes were placed in 250 mL flasks and 40 mL potato extract were added (300 g of raw potato in 1 L of boiling water for 15 min). Later, we deposited two discs of 0.5 cm of the mycelium in active growth of every pathogenic fungus and they were incubated in a growth chamber at 30 °C for ten days (Bruna, 1991). This was used as an inoculant for later tests.

Inhibition of mycelial growth *in vitro* of *Fusarium* spp. by *Bacillus* spp.

The biotests were carried out by direct confrontation with the widely used dual planting (Li *et al.*, 2011; Essghaier *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2016). In the center of 90 x 15 mm Petri dished with potato dextrose agar (PDA) medium, we placed a disc, 0.5 cm in diameter, of mycelium of the pathogen with 10 d of active growth, and inoculated 6 µL of a 1×10^8 UFC bacterial solution in four equidistant points around the mycelial growth at a distance of 2 cm. The dishes were incubated at 28 °C for 7 d. The radial growth was measured, and using this data, the percentage of mycelial inhibition was calculated, taking the fungal growth in PDA in the absence of bacteria as a control.

Los bioensayos se realizaron por confrontación directa con la técnica de cultivo dual ampliamente utilizada (Li *et al.*, 2011; Essghaier *et al.*, 2012; Rios *et al.*, 2016); en cajas Petri de 90 x 15 mm con medio agar de papa y dextrosa (PDA), se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio del fitopatógeno de crecimiento activo de 10 d en el centro de la caja y se inocularon 6 μ L de una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC, en cuatro puntos equidistantes alrededor del crecimiento micelial a una distancia de 2 cm, las cajas se incubaron a 28 °C durante 7 d. Se midió el crecimiento radial y con los datos se calculó el porcentaje de inhibición micelial, tomando como testigo el crecimiento del hongo en PDA sin la presencia de bacterias.

Pruebas de patogenicidad de *Fusarium equiseti* y *F. solani* en chile habanero.

Se utilizaron semillas de chile habanero cv. criollo desinfectadas con 2 % de hipoclorito de sodio y lavadas tres veces con agua destilada estéril. Se realizó la siembra en charolas de plástico de 98 cavidades con sustrato estéril comercial Cosmopeat®, esterilizado en una autoclave a 120 °C por 15 min. Se obtuvieron plántulas de 28 días después de la germinación (DDG) a las cuales se les realizó pruebas de patogenicidad para determinar la virulencia por acción de los hongos fitopatógenos. Se prepararon macetas en vasos de poliestireno expandido (unicel) de 32 oz, con 600 g de sustrato de una mezcla de suelo K'ancab (nomenclatura regional Maya) del tipo Luvisol y bovinaza (1:1) (Soria *et al.*, 2002), el tipo Luvisol son suelos arcillosos de color pardo rojizo ligeramente ácido (Bautista, 2005). El sustrato fue esterilizado a 120 °C por 15 min. A este sustrato se le adicionó 10 g de avena con el crecimiento de los fitopatógenos de 1×10^6 conidios por gramos de avena; el cual se cuantificó

Pathogenicity tests for *Fusarium equiseti* and *F. solani* in habanero chili.

Habanero chili cv. native seeds were used after being disinfected with 2 % sodium hypochlorite and washed 3 times with sterile distilled water. They were planted in plastic trays with 98 holes with the commercial sterile substrate Cosmopeat®, sterilized in an autoclave at 120 °C for 15 min. Plantlets were obtained 28 days after germination (DDG) and pathogenicity tests were run on them in order to determine the virulence by action of the pathogenic fungi. Pots were prepared using 32 oz styrofoam cups, with 600 g of substrate of a mixture of the soil K'ancab (regional Mayan name) of the type Luvisol and cow manure (1:1) (Soria *et al.*, 2002). Luvisol soils are reddish brown clay soil and slightly acidic (Bautista, 2005). The substrate was sterilized at 120 °C for 15 min. It was added 10 g of oats with the growth of the pathogens of 1×10^6 conids per grams of oats, which was quantified by taking a gram of oats with inoculant and adding 9 mL of sterilized distilled water. It was counted with the help of a Neubauer camera, one plantlet was placed in each pot, and in order to allow the pathogen to enter the plant, a 1 cm cut was performed on the apex of the root, in order to determine its virulence (Herrera *et al.*, 2011).

Evaluation of the resistance to wilting by *Fusarium* spp. in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

The disinfected habanero chili seeds were planted in plastic trays with 98 holes with the commercial sterile substrate Cosmopeat®. Fifteen days after germination (DDG) an inoculation was carried out, of 1 mL of bacterial suspension of 1×10^8 UFC mL⁻¹ on the base of the stems of the

tomando un gramo de avena con inóculo y adicionando 9 mL de agua destilada estéril, se realizó el conteo con la ayuda de una cámara de Neubauer, se depositó una plántula por maceta, y con el fin de permitir la entrada del patógeno a la planta, se le hizo un corte de 1 cm al ápice de la raíz, para determinar su virulencia (Herrera *et al.*, 2011).

Evaluación de la resistencia a la marchitez por *Fusarium* spp. en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

Las semillas de chile habanero desinfectadas se sembraron en charolas de plástico de 98 cavidades con sustrato estéril comercial Cosmopeat®. A los 15 días después de la germinación (DDG) se realizó una inoculación de 1 mL de suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC mL⁻¹ en la base del tallo de las plántulas, al testigo se le aplicó 1 mL de 0.9 % de NaCl. A los 28 DDG se realizó el trasplante en vasos de unicele de 32 oz con 600 g de sustrato (mezcla Luvisol y bovinaza), previamente inoculados con 10 g de avena que contenían 1×10^6 conidios·g⁻¹. Se aplicaron 3 mL de la solución bacteriana a los 28 y 35 DDG. La fertilización fue con la fórmula 125-100-150 de N-P-K (Soria *et al.*, 2002). Se estableció el experimento bajo condiciones de un invernadero tipo macrotúnel del Instituto Tecnológico de Conkal (21° 04' N y 89° 31' O), con seis tratamientos para cada fitopatógeno evaluado; cuatro cepas bacterianas, un tratamiento que consistió sin la inoculación bacteriana pero con la presencia de los hongos fitopatógenos y un testigo que consistió en plántulas sin inoculación de fitopatógenos ni de cepas bacterianas. Se estableció en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones para cada tratamiento, cada maceta representó una unidad experimental. Para asociar la resistencia inducida por la inoculación de las bacterias; cada cuatro días después de que aparecieron los síntomas, se estimó

plantlets. The control was applied 1 mL of 0.9 % of NaCl. At 28 DDG, the transplant was carried out in 32 oz styrofoam cups with 600 g of substrate (mixture of Luvisol and cow manure), previously inoculated with 10 g of oats that contained 1×10^6 conids·g⁻¹. After 28 and 35 DDG, 3 mL of the bacterial solution were added. Fertilization took place with the formula 125-100-150 of N-P-K (Soria *et al.*, 2002). The experiment was established under macrotunnel-type greenhouse conditions in the Instituto Tecnológico de Conkal (21° 04' N and 89° 31' O), with six treatments for each pathogen evaluated, four bacterial strains, a treatment that consisted of no bacterial inoculation, but with the presence of the pathogenic fungi, and a control that consisted in plantlets with no inoculation of pathogens of bacterial strains. It was established in a completely random design with 10 repetitions for each treatment; each pot represented an experimental unit. To associate the resistance induced by the bacterial inoculation, every four days after the appearance of the symptoms, the severity was estimated using a scale of five classes: 1=0 %, 3=10 %, 5=25 %, 7=50 %, and 9=100 % damage (CIAT, 1987). Using the severity data, progress curves of the disease were made, and the model of the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was used to calculate the intensity of the disease. On the 28th day after inoculation with the pathogens, the final severity of the disease was calculated with the arcsin instruction; $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$, using the parameter of Y_{final} (Campbell and Madden, 1990). Finally, using the Abbott procedure (1925), the efficiency of the bacterial strains as resistance inducers was validated. Averages were compared when the significance between treatments was determined using Tukey ($p \leq 0.05$). To verify result reproducibility, the experiments were repeated in two periods (December, 2014 and February, 2015);

la severidad con apoyo de una escala de cinco clases: 1=0 %, 3=10 %, 5=25 %, 7=50 % y 9=100 % de daño (CIAT, 1987). Con los datos de severidad, se construyeron curvas del progreso de la enfermedad, y con el modelo del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) se calculó la intensidad de la enfermedad. A los 28 días después de la inoculación con los fitopatógenos, se calculó la severidad final de la enfermedad con la instrucción de arcoseno; $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$, mediante el parámetro de Y_{final} (Campbell y Madden, 1990). Finalmente mediante el procedimiento de Abbott (1925) se validó la eficacia de las cepas bacterianas como inductoras de resistencia. Se aplicó el comparador de medias cuando se determinó significancia entre tratamientos con Tukey ($p \leq 0.05$). Con el propósito de verificar la reproducibilidad de resultados, los experimentos se repitieron en dos periodos (diciembre de 2014 y febrero de 2015), para el análisis se utilizaron los promedios de las dos evaluaciones. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa SAS versión 9.3 para Windows (SAS Institute Inc. 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* spp.

Todas las cepas mostraron inhibir el crecimiento micelial de los patógenos, los porcentajes de inhibición en *F. equiseti* fueron de 21.28 a 71.70 % y para el caso de *F. solani* fue de 37.4 a 69.92 % (Cuadro 1) el mayor efecto fue observado con *B. subtilis* CBMT51 sobre el crecimiento de *F. equiseti*, y la cepa CBRF8 mostró el mayor efecto contra ambos patógenos con valores arriba del 63 %. La cepa *B. cereus* BL8, reportada como promotora de crecimiento, mostro porcentajes de inhibición

for the analysis, the averages of both evaluations were used. The statistical analyses were carried out using the program SAS version 9.3 for Windows (SAS Institute Inc. 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro activity of *Bacillus* spp. against *Fusarium* spp.

All strains showed inhibition of the mycelial growth of the pathogens; the percentages of inhibition in *F. equiseti* were between 21.28 and 71.70 %, and for *F. solani*, it was 37.4 to 69.92 % (Table 1). The greatest effect was observed with *B. subtilis* CBMT51 on the growth of *F. equiseti*, and strain CBRF8 showed the greatest effect against both pathogens with values of over 63 %. The strain *B. cereus* BL8, reported as a growth enhancer, showed percentages of inhibition significantly lower than the two strains mentioned above. The range of inhibition reported by several authors is broad, percentages of inhibition of 90 % are reported for *B. subtilis* strains against *Fusarium* sp. (Badía *et al.*, 2011), and, on the other hand, percentages of inhibition of 29.4 % were reported for *F. avenacum* (Essghaier *et al.*, 2012), and for *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens* against *F. oxysporum* of 42.0 and 51.5 % (Rios *et al.*, 2016); the latter are within the range obtained in this study. Strains CBMT2 and CBMT51 were the only ones to present halos of inhibition of mycelial growth in confrontation with *F. equiseti* with halos measuring 3.76 and 6.37 mm, respectively, which correspond to 18.3 and 31.5 % of inhibition (Figure 1). The antagonistic activity of *Bacillus* is due to several mechanisms, such as competition for the colonization of the rhizosphere (Compant *et al.*, 2005), production of lipopeptides such as Iturin,

Cuadro 1. Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* spp. a los siete días de confrontación.
Table 1. Activity *in vitro* of *Bacillus* spp. against *Fusarium* spp. after seven days of confrontation.

Cepas de	Inhibición del crecimiento micelial (%)	
	<i>F. equiseti</i> ITCF1	<i>F. solani</i> ITCF2
<i>B. subtilis</i> CBRF4	52.29±2.24 c°	47.81±4.15 e
<i>Bacillus</i> sp. CBRF5	58.76±0.26 bc	61.60±1.05 b
<i>B. subtilis</i> CBRF8	63.89±0.26 abc	69.92±0.47 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> CBRF11	58.05±0.62 bc	58.37±0.45 bcd
<i>Bacillus</i> sp. CBRM9	60.15±0.55 abc	60.75±0.22 bc
<i>B. subtilis</i> CBMT2	65.08±0.58 ab	53.43±0.39 cde
<i>B. subtilis</i> CBMT51	71.70±0.35 a	56.81±1.30 bcd
<i>Bacillus</i> sp. CBCC58	21.28±5.08 e	22.34±1.14 g
<i>Bacillus</i> sp. CBCK44	61.99±0.50 abc	46.36±1.28 e
<i>B. cereus</i> BL18	37.34±632 d	37.40±2.59 f
Testigo	0.00±0.0 f	0.00±0.0 h

°Medias con letra distinta son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) / °Averages with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$).

significativamente menores a las dos cepas mencionadas. El rango de inhibición reportados por varios autores es amplio, porcentajes de inhibición de 90 % son reportados por cepas de *B. subtilis* contra *Fusarium* sp. (Badía *et al.*, 2011), por el contrario porcentajes de inhibición de 29.4 % fue reportado para *F. avenacum* (Essghaier *et al.*, 2012), y para *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* contra *F. oxysporum* de 42.0 y 51.5 % (Rios *et al.*, 2016), estos últimos se encuentran dentro del rango obtenido en el presente estudio. Las cepas CBMT2 y CBMT51, fueron las únicas que presentaron halos de inhibición del crecimiento micelial en confrontación contra *F. equiseti* con halos de 3.76 y 6.37 mm, respectivamente, que corresponden al 18.3 y 31.5 % de inhibición (Figura 1). La actividad antagónica de *Bacillus* se debe a varios mecanismos como competencia por la colonización de la rizosfera (Compant *et al.*, 2005), producción de lipopéptidos como Iturina, Fengicina y Surfactina (Kim *et al.*, 2010), y producción de enzimas líticas (Pleban *et al.*, 1997; Chang *et al.* 2010). La cepa *B. subtilis* Pla10 produce antibióticos de la familia Iturina A

Fengycin, and Surfactin (Kim *et al.*, 2010), and the production of lytic enzymes (Pleban *et al.*, 1997; Chang *et al.* 2010). The strain *B. subtilis* Pla10 produces antibiotics of the family Iturin A and Surfactin; the purified fractions showed that only Iturin A presented fungicidal activity (Ragazzo *et al.*, 2011). The purified chitinase from *Bacillus cereus* YQ 308 inhibits the elongation of *F. oxysporum* and *F. solani* hyphae, reducing the biomass of fungi in comparison with the control (Chang *et al.*, 2003). According to the results, four *Bacillus* strains were selected for the wilting control tests in habanero chili plants based on its antifungal activity; the strain CBRF8, which showed the highest percentage of mycelial inhibition in *F. solani*, the strain CBMT51, which showed the highest percentage of inhibition and halo of inhibition in *F. equiseti*, strain CBMT2, with antifungal activity against both pathogens and the presence of inhibition halo in *F. equiseti*, and the strain BL18 was included, with a moderate antifungal activity, although reported as having plant growth enhancing properties.

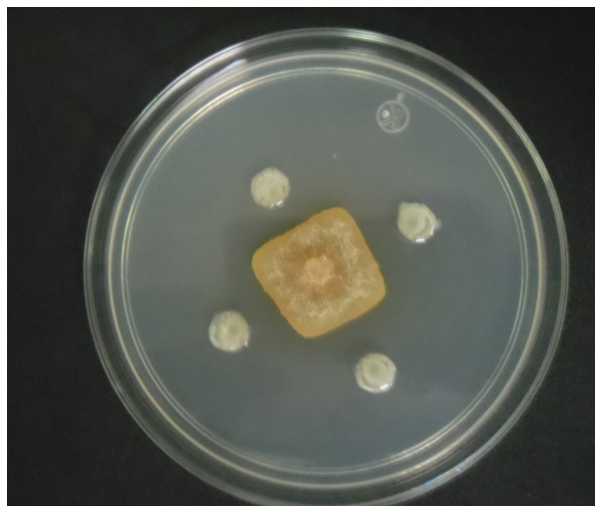
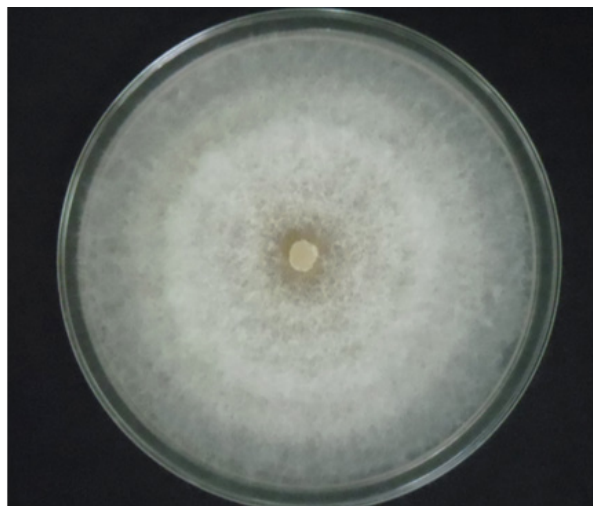


Figura 1. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* CBMT51 contra *Fusarium equiseti* a los siete días de confrontación, en comparación con el testigo.

Figure 1. Antagonism *in vitro* of *Bacillus subtilis* CBMT51 against *Fusarium equiseti* after seven days of confrontation, compared to the witness.

y Surfactina, las fracciones purificadas mostraron que solo Iturina A es la que presentó actividad fungicida (Ragazzo *et al.*, 2011). La quitinasa purificada de *Bacillus cereus* YQ 308 inhibe la elongación de hifas de *F. oxysporum* y *F. solani*, disminuyendo la biomasa de los hongos en comparación al testigo (Chang *et al.*, 2003). De acuerdo con los resultados se seleccionaron cuatro cepas de *Bacillus* para los ensayos de control de la marchitez en chile habanero con base en su actividad antifúngica; la cepa CBRF8 que mostró el mayor porcentaje de inhibición micelial en *F. solani*, la cepa CBMT51 que mostró el mayor porcentaje de inhibición y halo de inhibición en *F. equiseti*, la cepa CBMT2, con actividad antifúngica contra ambos patógenos y presencia de halo de inhibición en *F. equiseti*, y se incluyó a la cepa BL18 con moderada actividad antifúngica pero reportada con propiedades de promoción de crecimiento vegetal.

Pruebas de patogenicidad de *Fusarium equiseti* y *F. solani* en chile habanero.

Pathogenicity tests for *Fusarium equiseti* and *F. solani* in habanero chili.

The pathogenicity tests for *Fusarium equiseti* ITCF1 and *F. solani* ITCF2 inoculated in habanero chili plants, showed virulence, since they induced characteristic symptoms such as chlorosis, flaccidity, and partial defoliation partial rotting of roots and neck, which occasionally rose to 3 to 7 cm above the base of the stem. Despite records of 100 % incidence with both species of fungus, severity was greater with *F. solani* ITCF2, where it recorded 90.0 %, and lower with *F. equiseti* ITCF1 with 77.5 %, without representing a statistical difference (Table 2). The symptoms of the disease began to manifest themselves after two weeks of inoculation with the pathogen. These results, in terms of incidence and severity, were similar to those obtained in other studies on *Capsicum annuum* L. and *Solanum lycopersicum* L., obtaining an incidence of 100 % and severity of 80 to 100 % with two strains of *F. oxysporum* (Apodaca *et al.*,

Las pruebas de patogenicidad por *Fusarium equiseti* ITCF1 y *F. solani* ITCF2 inoculadas en planta de chile habanero, mostraron virulencia, al inducir síntomas característicos como: clorosis, flacidez y defoliación parcial, pudrición de raíces y cuello, que en ocasiones ascendió de 3 a 7 cm de la base del tallo. A pesar de registrarse el 100 % de incidencia con las dos especies de hongos, la severidad fue mayor con *F. solani* ITCF2 donde registró 90.0 % y menor con *F. equiseti* ITCF1 con 77.5 %, sin que represente diferencia estadística (Cuadro 2). Los síntomas de la enfermedad se empezaron a manifestar a la segunda semana de inoculación con el patógeno. Estos resultados en cuanto a la incidencia y severidad fueron similares a los obtenidos en otros estudios en *Capsicum annuum* L. y *Solanum lycopersicum* L., obteniendo un 100 % de incidencia y severidad de 80 a 100 % con dos cepas de *F. oxysporum* (Apodaca *et al.*, 2004). En pruebas de patogenicidad en plantas de *Thevetia peruviana* inoculadas con especies de *Fusarium*, encontraron a *F. solani* provocando síntomas como: necrosis en el tallo, hojas cloróticas y marchitez, determinando a esta especie como la más virulenta (Herrera *et al.*, 2011), resultados que concuerdan con las del presente estudio. Se realizó un análisis de varianza con el modelo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para poder determinar la patogenicidad y agresividad de los dos hongos, se

2004). In pathogenicity tests on *Thevetia peruviana* plants inoculated with *Fusarium* species, *F. solani* was found to cause symptoms such as necrosis in the stem, chlorotic leaves, and wilting, determining this species as the most virulent (Herrera *et al.*, 2011), results which agree with those in this study. An analysis of variance was carried out with the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) model to determine the pathogenicity and aggressiveness of the two fungi, and for *F. equiseti* and *F. solani*, 1120.0 and 1201.0 units day⁻¹ were obtained, respectively. There was no significant difference in the virulence of the fungi (Table 2), although a greater unit can be observed of plants diseased with *F. solani*. For the control, without the presence of fungi, there were 0.0 diseased units, keeping the plants healthy and vigorous until the end of the experiment.

Evaluation of the resistance to wilting by *Fusarium* spp. in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

The appearance of symptoms in plants inoculated with *F. equiseti* and *F. solani* were observed eight days after inoculation. In general, in inoculated plants, *F. solani* displayed more virulence than *F. equiseti* when inducing greater severity during the progress of the disease; in control plants,

Cuadro 2. Incidencia y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) de *F. equiseti* y *F. solani* en plantas de chile habanero.

Table 2. Incidence and area under the disease progress curve (AUDPC) for *F. equiseti* and *F. solani* in habanero chili plants

Tratamiento	Incidencia final (%)	(%) Y _{final}	ABCPE (Unidad.día ⁻¹)
<i>F. equiseti</i>	100±0.0 a	77.5±12.0 a	1120.0±5.45 a°
<i>F. solani</i>	100±0.0 a	90.0± 6.6 a	1201.0±5.13 a
Testigo	0.0 b	0± 0.0 b	0.0±0.0 b

°Medias con letras diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey 0.05) / ° Averages with different letters in each column are statistically different (Tukey 0.05).

obtuvo para *F. equiseti* y *F. solani* 1120.0 y 1201.0 unidades.día⁻¹, respectivamente, no hubo diferencia significativa en la virulencia de los hongos (Cuadro 2), sin embargo, se puede observar una mayor unidad de plantas enfermas por *F. solani*. Para el testigo sin la presencia de hongos hubo 0.0 unidades enfermas manteniéndose las plantas sanas y vigorosas hasta el final del experimento.

Evaluación de la resistencia a la marchitez por *Fusarium* spp. en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

La aparición de síntomas en plantas inoculadas con *F. equiseti* y *F. solani* se observaron a los ocho días posteriores a la inoculación. En general, en las plantas inoculadas, *F. solani* mostró mayor virulencia que *F. equiseti*; al inducir mayor severidad durante el progreso de la enfermedad; en plantas testigo sin la inoculación de patógenos, no se presentó la enfermedad (Figura 2). El análisis de la intensidad

without the inoculation of pathogens, the disease was not present (Figure 2). The analysis of the intensity of the disease showed less AUDPC with the inoculations of the strains CBMT51 and BL18 against *F. equiseti*, although only BL18 allowed less severity in plants infected with *F. solani*. At the end of the experiment, the parameter Y_{final} displayed, with CBMT51, a severity of 39.7 % in *F. equiseti*, while BL18 against *F. solani* gave 41.7 %. This helped calculate the higher levels of disease control with 47.8 and 50.9 % efficiency, respectively (Table 3). In trials with *B. subtilis* CAS15 applications on *C. annuum*, it reduced the severity of the disease caused by *F. oxysporum*, with a control efficiency of 56.9 %. Similar to that obtained in this study, this efficiency was attributed to a systemic resistance induction (SRI) (Yu *et al.*, 2011). The SRI has been observed in *C. annuum* against *Phytophthora capsici* when *B. megaterium* was used, when reducing the severity of the disease between 18.3 and 33.3 %, and a

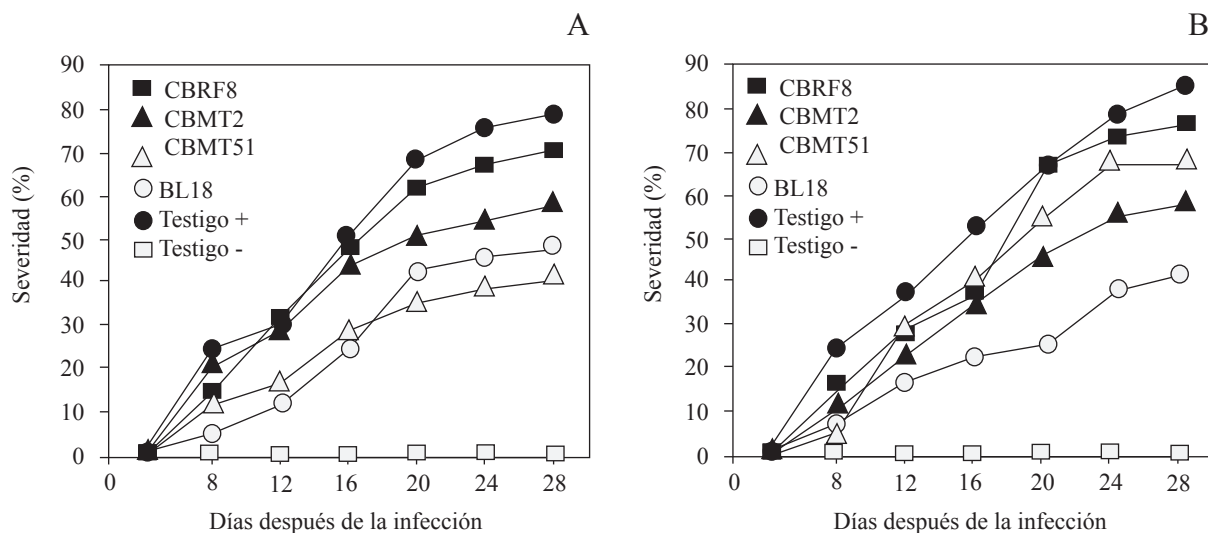


Figura 2. Curvas del progreso de la enfermedad de la severidad por marchitez inducida por *Fusarium equiseti* (A) y *F. solani* (B) a los 28 días después de la infección en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

Figure 2. Disease progress curves of the severity by wilting induced by *Fusarium equiseti* (A) and *F. solani* (B) 28 days after the infection in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

de la enfermedad, mostró menor ABCPE con la inoculación de las cepas CBMT51 y BL18 contra *F. equiseti*, sin embargo, solo la BL18 permitió menor severidad en las plantas infectadas con *F. solani*. Al final del experimento, el parámetro de Y_{final} , registró con CBMT51 una severidad del 39.7 % en *F. equiseti*, mientras que con BL18 se obtuvo contra *F. solani* un 41.7 %. Esto permitió calcular los mayores niveles de control de la enfermedad con 47.8 y 50.9 % de eficacia, respectivamente (Cuadro 3). En ensayos con aplicaciones de *B. subtilis* CAS15 en *C. annuum* redujo la severidad de la enfermedad causada por *F. oxysporum*, con eficiencia de control del 56.9 %, similares a los obtenidos en este estudio, esta eficacia se atribuyó a una inducción de resistencia sistémica (IRS) (Yu *et al.*, 2011). La IRS se ha evidenciado en *C. annuum* contra *Phytophthora capsici* cuando se utilizó *B. megaterium* al reducir la severidad de la enfermedad del 18.3-33.3 %, y una eficiencia de control del 23.1-57.7 % (Akgül y Mirik, 2008). En el cultivo de *Cucumis sativus* con problemas de *F. oxysporum*, evaluaciones con *Bacillus* B068150, redujo la severidad en un 49.32 %

control efficiency of 23.1 to 57.7 % (Akgül and Mirik, 2008). In the *Cucumis sativus* crop with *F. oxysporum* problems, evaluations with *Bacillus* B068150, reduced the severity by 49.32 %, which meant a control of 50.68 % (Li *et al.*, 2011). In *S. lycopersicum*, resistance was conferred against *Ralstonia solanacearum* when using *B. subtilis* (CYBS-5) with a control efficiency of over 50 % (Chen *et al.*, 2012). Likewise, in *S. lycopersicum* L. affected by *F. oxysporum*, the implementation of *Pseudomonas fluorescens* significantly reduced the incidence and severity of wilting between 4.86 and 74.49 %, where the preinoculation with bacteria tends to improve the activation of the SRI (Yu *et al.*, 2011). Some rhizobacteria are capable of producing salicylic acid, responsible for SRI, as shown with *P. aeruginosa* TNSK2 against *Botrytis cinerea* (De Meyer and Hofte, 1997). These attributes can be used for the biological control of pathogens that originate in the soil, which can reduce the use of synthetic pesticides.

CONCLUSIONS

Cuadro 3. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), severidad y eficiencia del control de *Fusarium equiseti* y *F. solani* en plantas de chile habanero inoculadas con *Bacillus* spp.

Table 3. Area under the disease progress curve (AUDPC), severity and control efficiency for *Fusarium equiseti* and *F. solani* in habanero chili plants inoculated with *Bacillus* spp.

Tratamientos	<i>F. equiseti</i>			<i>F. solani</i>		
	ABCPE (% Unidad·día ¹)	Y_{final} (%)	Efic. (%)	ABCPE (% Unidad·día ¹)	Y_{final} (%)	Efic. (%)
CBRF8	1073.0 ab ^o	68.0 ab	10.8	1068.0 ab	76.2 ab	10.3
CBMT2	956.0 ab	56.7 ab	25.5	829.0 ab	58.5 ab	31.2
CBMT51	629.0 b	39.7 b	47.8	1064.5 ab	67.2 ab	20.9
BL18	630.0 b	47.7 ab	37.8	587.5 b	41.7 b	50.9
Testigo +	1198.0 a	76.3 a	0	1260.0 a	85.0 a	0
Testigo -	0.0 c	0.0 c	0	0.0 c	0.0 c	0
DMS	529.0	32.1		740.5	36.4	

^oMedias con letras diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$). DMS = diferencia mínima significativa; Testigo + con presencia del patógeno; Testigo - sin patógenos ni bacterias / ^o Averages with different letters in each column are statistically different (Tukey $P \leq 0.05$). DMS = minimum significant difference; Control + with presence of the pathogen; Control - without pathogens or bacterias.

lo que significó un control del 50.68 % (Li *et al.*, 2011). En *S. lycopersicum* se confirió resistencia contra *Ralstonia solanacearum* al utilizar *B. subtilis* (CYBS-5) con una eficacia de control mayor al 50 % (Chen *et al.*, 2012). También en *S. lycopersicum* L. afectados por *F. oxysporum* la implementación de *Pseudomonas fluorescens* redujo significativamente la incidencia y severidad de la marchitez del 4.86-74.49 %, donde la pre-inoculación con las bacterias tiende a mejorar la activación de IRS (Yu *et al.*, 2011). Algunas rizobacterias tienen la capacidad de producir ácido salicílico; responsable de la IRS, como se demostró con *P. aeruginosa* 7NSK2 contra *Botrytis cinerea* (De Meyer y Hofte, 1997). Estos atributos pueden ser aprovechados para el control biológico de fitopatógenos con origen en el suelo reduciendo, lo que puede disminuir el uso de plaguicidas sintéticos.

CONCLUSIONES

Las cepas bacterianas en estudio presentaron propiedades antagónicas *in vitro* contra *F. solani* y *F. equiseti*, estos patógenos presentaron virulencia en *C. chinense* al provocar marchitez a las plantas. Para la resistencia a la marchitez en *C. chinense*, la inoculación de las cepas *B. subtilis* CBMT51 y *B. cereus* BL18 redujeron la severidad provocada por *F. equiseti*, sin embargo, sólo la BL18 la redujo en *F. solani*. Se observó que la capacidad de control de la enfermedad está asociada con el tipo de cepa bacteriana y por la especie del fitopatógeno. Las cepas CBMT51 y BL18 mostraron propiedades en el biocontrol de marchitez ocasionadas por *Fusarium*, por lo que pueden ser utilizadas en la protección del cultivo de chile habanero.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto parcialmente financiado por TecNM, los autores

The bacterial strains in this study presented antagonistic properties *in vitro* against *Fusarium solani* and *F. equiseti*, both of which displayed virulence in *Capsicum chinense*, causing wilting in plants. For the resistance to wilting in *C. chinense*, the inoculation of the strains *Bacillus subtilis* CBMT51 and *B. cereus* BL18 reduced the severity caused by *F. equiseti*, although only BL18 decreased it in *F. solani*. The capacity to control the disease was observed to be related to the type of bacterial strain and the species of the pathogen. Strains CBMT51 and BL18 displayed properties in the biocontrol of wilting caused by *Fusarium*, therefore they can be used to protect habanero chili crops.

ACKNOWLEDGEMENTS

Project partially funded by TecNM, the authors wish to thank Alejandro García Ramírez for his technical support.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

agradecen a Alejandro García Ramírez por su apoyo técnico.

## LITERATURA CITADA

- Albañil-Juárez J A, Mariscal-Amaro LA, Martínez-Martínez TO, Anaya-López JL, Cisneros-López HC y Pérez-Ramírez HA. 2015. Estudio regional de fitopatógenos asociados a la secadera del chile en Guanajuato, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11: 2191-2197. Disponible en línea: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/Agricolas/article/view/4044/3378>
- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18: 265-267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Ahemad M and Khan MS. 2011. Functional Aspects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Recent Advancements. Insight Microbiology 1: 39-54. <http://dx.doi.org/10.5567/IMICRO-IK.2011.39.54>
- Akgül DS and Mirik M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* stra-

- ins. Journal of Plant Pathology 90: 29-34. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v90i1.588>
- Amarasan N, Jayakumar V and Thajuddin N. 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. Indian Journal of Biotechnology 13: 247-255. Disponible en línea: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/29149/1/IJBT%2013%282%29%20247-255.pdf>
- Apodaca-Sánchez MA, Zavaleta-Mejía E, Osada-Kawasoe S, García-Espinosa R y Valenzuela-Ureta JG. 2004. Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 22-29. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222104>.
- Badía RMM, Hernández TB, Murrel LJA, Mahillon J y Pérez M. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Revista Brasileira de Agroecología 6: 90-99. Disponible en línea: <http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/9924/6778>
- Bautista F, Palma-López D y Huchim-Malta W. 2005. Actualización de la clasificación de los suelos del estado de Yucatán. p. 105-222. En: F. Bautista y G. Palacios (Eds.) Caracterización y Manejo de los Suelos de la Península de Yucatán. Implicaciones Agropecuarias, Forestales y Ambientales. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de Yucatán. 282.
- Bruna A. 1991. Marchitez y pudrición de corona y raíces de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht. sp. *asparagi* Cohen. Agricultura Técnica (Chile) 51: 52-54. Disponible en línea: [http://www.chileanjar.cl/files/V5111A08\\_es.pdf](http://www.chileanjar.cl/files/V5111A08_es.pdf)
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to plant epidemiology. John Wiley and Sons. New York. 532 p.
- Chang WT, Chen CS and Wang SL. 2003. An Antifungal Chitinase Produced by *Bacillus cereus* with Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source. Current Microbiology 47: 102-108. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-002-3955-7>
- Chang WT, Chen ML and Wang SL. 2010. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 945-950. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-009-0244-7>
- Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R and Guo J. 2012. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environmental Microbiology 10: 1-17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x>
- CIAT. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Art van Schoonhoven y Marcial Pastor-Corrales (comp). Cali, Colombia. 42 p. Disponible en línea: [https://books.google.com.mx/books?id=mpgIE\\_jDedMC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=Sistema+estandar+para+la+evaluacion+de+germoplasma+de+fr%C3%ADjol.&source=bl&ots=CLo9IQyb3M&sig=PA4zRe7HGCi9C5rNeK55kwA8XU&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi5wrGr9\\_KAhW1h4KHJeA\\_4Q6AEIzAC#v=onepage&q=Sistema%20estandar%20para%20la%20evaluacion%20de%20germoplasma%20de%20fr%C3%ADjol.&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=mpgIE_jDedMC&pg=PA5&lpg=PA5&dq=Sistema+estandar+para+la+evaluacion+de+germoplasma+de+fr%C3%ADjol.&source=bl&ots=CLo9IQyb3M&sig=PA4zRe7HGCi9C5rNeK55kwA8XU&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi5wrGr9_KAhW1h4KHJeA_4Q6AEIzAC#v=onepage&q=Sistema%20estandar%20para%20la%20evaluacion%20de%20germoplasma%20de%20fr%C3%ADjol.&f=false)
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka EA. 2005. Use of growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71: 4951-4959. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- De Meyer G and Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. Phytopathology 87: 588-593. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.6.588>
- Essghaier B, Hedi A, Hajlaoui MR, Boudabous A, and Sadfi-Zouaoui N. 2012. *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. African Journal of Microbiology Research 6: 4073-4083. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.403>
- Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo, FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E y Reyes-Valdés MH. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 24: 105-114. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224204>
- Herrera-Parra E, Bacab-Pérez IM, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, y Ruiz-Sánchez E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control *in vitro*. Fitosanidad 15: 231-236. Disponible en línea: <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/139>
- Kim PI, Ryu J, Kim YH and Chi YT. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 138-145. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
- Li L, Ma J, Li Y, Wang Z, Gao T and Wang Q. 2011. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. Crop Protection 35: 29-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.004>
- Luna ML, Martínez PRA, Hernández IM, Arvizu MSM y Pacheco AJR. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fitotecnia Mexicana 36: 63-69. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61025678008>
- Medina-Lara F, Echeverría-Machado I, Pacheco-Arjona R, Ruiz-Lau N, Guzmán-Antonio A and Martínez-Estévez M. 2008. Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience 43: 1549-1554. Disponible en: <http://hortsci.ashspublishations.org/content/43/5/1549.full>
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A y José Tun-Suárez JM. 2013. Actividad antagonista de cepas nativas de *Bacillus* spp. contra *Fusarium* sp. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Oaxaca de Juárez, Oaxaca,

- México. Resumen, p. 26-29.
- Martínez MA, Martínez MC, Bielza P, Tello J and Lacasa A. 2011. Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* densities in pepper crops. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology* 38: 3-11. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0826-2>.
- Peña-Yam LP, Ruiz-Sánchez E, Barboza-Corona JE and Reyes-Ramírez A. 2016. Isolation of Mexican *Bacillus* Species and Their Effects in Promoting Growth of Chili Pepper (*Capsicum annuum* L. cv Jalapeño). *Indian Journal of Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-016-0582-8>.
- Pleban S, Chernin L and Chet I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 25: 284-288. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00224.x>
- Ragazzo-Sánchez JA, Robles-Cabrera A, Lomelí-González L, Luna-Solano G y Calderón-Santoyo ML. 2011. Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo serie Horticultura*. 17: 5-11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60920104001>
- Ramarathnam R, Bo S, Chen Y, Fernando WG, Xuewen G and De Kievit T. 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin-and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 901-911. <http://dx.doi.org/10.1139/W07-049>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 84-99. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Ruiz-Sanchez E, Mejia-Bautista MA, Serrato-Diaz M, Reyes-Ramirez A, Estrada-Giron Y y Valencia-Botin AJ. 2016. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia* 50: 133-148. Disponible en línea: <http://www.colpos.mx/agrociencia/Bimestral/2016/feb-mar/art-1.pdf>
- Saravanakumara D, Vijayakumar C, Kumar N and Samiyappan R. 2007. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister blight disease. *Crop Protection* 26: 556-565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.05.007>
- SAS Institute. 2010. User's Guide: Statistics, version 9.3. SAS Inst. Inc., Cary, North Caroline, USA.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2013. Anuarios estadísticos. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. <http://www.siap.gob.mx/>
- Soria FM, Tun SJ, Trejo RA y Terán SR. 2002. Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). SEP. DGTA. ITA-2 Conkal, Yuc, México. 75 p.
- Sosa-Pech M, Ruiz-Sánchez E., Mejía-Bautista M, Reyes-Ramírez A., Cristóbal-Alejo J, Valencia-Botín A y Gutiérrez-Alonzo O. 2012. Actividad antagonista *in vitro* de aislados de la clase Bacilli de la península de yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. *Universidad y Ciencia* 28:279-284. Disponible en <http://132.248.10.25/era/index.php/rera/article/view/16>
- Yu X, Ai C and Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* 47: 138-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>.