







Actividad Antagónica de *Pseudomonas donghuensis* y *Bacillus subtilis* para el manejo de fitopatógenos del “Damping off” del cultivo del chile.

Antagonistic activity of *Pseudomonas donghuensis* and *Bacillus subtilis* for the management of “Damping off” phytopathogens of the chile crop.

Jiménez-Pérez, O.¹ , Gallegos-Morales, G.^{1*} , Hernández-Castillo F. D.¹ , Espinoza-Ahumada, C. A.² , Castro del Angel E.¹ , Sanchez-Yañez, J. M.³ 

¹ Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

² Instituto Tecnológico Superior De El Mante. Carretera Federal Libre Mante-Ciudad Valles Km 6.7, Congregación Quintero, Tamaulipas; C. P. 89930, Tamaulipas, México.

³ Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones en Química y Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida Francisco J Mujica S/N. Colonia Felicitas del Rio, C. P. 58000, Morelia, Michoacán, México.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo F. D., Espinoza-Ahumada, C. A., Castro del Angel E., Sanchez-Yañez, J. M. (2023). Antagonistic activity of *Pseudomonas donghuensis* and *Bacillus subtilis* for the management of “Damping off” phytopathogens of the chile crop. *Revista Bio Ciencias*, 10 e1382. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1382>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: July 18th 2022.

Accepted/Aceptado: January 11th 2023.

Available on line/Publicado: February 12th 2023.

RESUMEN

Se evaluó la efectividad de *Pseudomonas donghuensis* y *Bacillus subtilis* para el control de *Fusarium oxysporum* y *Pythium aphanidermatum* causantes del ahogamiento de plántulas de chile en invernadero. Se comprobó su patogenicidad para ocasionar la enfermedad y se realizaron pruebas de antagonismo en placas con PDA enriquecido. Mediante la confrontación *in vitro* de estos fitopatógenos con tres cepas de *Bacillus subtilis* se comprobó que este esporulado inhibió en mayor o menor grado (39.35- 56.24 %) el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, pero no tuvo efecto alguno para *P. aphanidermatum*, ningún *Bacillus* inhibió a este Oomycete, debido a su rápido crecimiento en la placa de cultivo (36 h de incubación). En contraste *P. donghuensis* inhibió en un 56 % el crecimiento de *P. aphanidermatum*, y no presentó efecto inhibitorio para *F. oxysporum*, por lo que la mezcla de ambos antagonistas pudiera tener potencial para el control de los problemas de ahogamiento “Damping off” causados por estos fitopatógenos.

PALABRAS CLAVE: *Bacillus subtilis*, Damping off, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas donghuensis*, *Pythium aphanidermatum*.

*Corresponding Author:

Gabriel Gallegos-Morales. Departamento de Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México. Phone: 844 204 4627. E-mail: ggalmor@uaaan.edu.mx

ABSTRACT

The effectiveness of the *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas donghuensis* strains for the control of *Fusarium oxysporum* and *Pythium aphanidermatum*, which cause the drowning of chili seedlings in the greenhouse, was evaluated. Its pathogenicity to cause the disease was verified and antagonism tests were obtained in culture plates with enriched PDA. Through the *in vitro* confrontation of these phytopathogens with three strains of the species *Bacillus subtilis*, it was observed that this sporulate has the capacity to inhibit to a greater or lesser degree (39.35-56.24 %) the mycelial growth of *F. oxysporum*, but not the from *P. aphanidermatum*, none of the *Bacillus* isolates used in this study had an effect in inhibiting this Oomycete, since it grew faster than the spore-forming bacteria, since *P. aphanidermatum* developed and grew to fill the culture plate in just 36 hours. On the other hand, *P. donghuensis* inhibited the growth of this last phytopathogen by 56 %, however, it did not present an inhibition effect against *F. oxysporum*, so it could be feasible to use mixtures of these two antagonists for the management of this disease and be able to control Damping off problems caused by these phytopathogens.

KEY WORDS : *Bacillus subtilis*, Damping off, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas donghuensis*, *Pythium aphanidermatum*.

Introducción

Una de las enfermedades más común que afecta la producción plántula de Chile en almácigos y en invernadero es conocida como "Damping off. Los fitopatógenos que la provocan son un complejo de hongos que incluyen a *Fusarium* spp, *Rhizoctonia solani*, y los oomicetos *Pythium* spp y *Phytophthora capsici* (González *et al.*, 2013; Larios *et al.*, 2019). Esta enfermedad se considera cosmopolita y una de las más importantes en plántulas, por ocasionar pérdidas hasta del 100 %. Los daños por esta enfermedad se observan en etapa de preemergencia, postemergencia y en campo después del trasplante (Reveles-Hernández *et al.*, 2010; Hernández- Hernández *et al.*, 2018). Los síntomas de esta enfermedad son; pudrición de semillas, necrosamiento del hipocótilo, estrangulamiento necrótico en la base del tallo, pudrición de raíces, marchitez y la muerte de la plántula (Reveles-Hernández *et al.*, 2010). Para su control los agricultores se basan principalmente en aplicaciones de fungicidas químicos (Captan, Metalaxil, Azoxystrobin, entre otros), donde se reporta baja efectividad y resistencia de los fitopatógenos, además de toxicidad al hombre y contaminación ambiental (Castillo- Reyes *et al.*, 2015; Hernández- Hernández *et al.*, 2018; Larios *et al.*, 2019).

Una opción de manejo alternativo de las enfermedades vegetales es el control biológico mediante la aplicación de microorganismos antagonistas (Hernández- Hernández *et al.*, 2018;

Larios *et al.*, 2019), en los que se encuentran varias especies de *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp, *Trichoderma* spp, entre otros (Asaka & Shoda, 1996; Gravel *et al.*, 2005), los cuales no son perjudiciales para la salud y el ambiente (Larios *et al.*, 2019), ni causan resistencia (Espinoza-Ahumada *et al.*, 2019). Estos microorganismos actúan por diferentes modos de acción, como lo son: parasitismo, competencia por espacio y nutrientes, síntesis de antibióticos o inducción de resistencia sistémica en las plantas (Chirino-Valle *et al.*, 2016; Espinoza-Ahumada *et al.*, 2019), además, algunos géneros son considerados como promotores del crecimiento vegetal (Sivasakthi *et al.*, 2014). Entre las especies que destacan por su alta capacidad de producir compuestos antifúngicos de bajo peso molecular sobresale la especie *Pseudomonas donghuensis* la cual produce cinco veces más sideróforos que las demás especies, siendo esta especie una buena opción para el control de fitopatógenos (Gao *et al.*, 2015), ya que ha demostrado poseer efecto antagónico en contra de diversos fitopatógenos (Ossowicki *et al.*, 2017). Por lo anterior, este trabajo se realizó con el propósito de comprobar la efectividad de aislados bacterianos (*Bacillus subtilis* y *P. donghuensis*) capaces de inhibir el crecimiento de los agentes causantes del “Damping off” del chile, como una alternativa biológica para el manejo de esta enfermedad.

Material y Métodos

Ubicación del experimento

El trabajo de investigación se realizó en Laboratorio de Microbiología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicada en Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, 25315 Saltillo, Coahuila, México.

Material biológico

Las cepas de las bacterias antagonistas fueron proporcionadas por el cepario de Microbiología del Departamento de Parasitología de la UAAAN, las cuales consistieron en tres aislados del género *Bacillus* spp (B15, BITV y BIBT) y un aislado de *Pseudomonas* sp (Pd) recuperado de raíz de zacatón (*Muhlenbergia macroura*). Los aislados se reactivaron y purificaron en Agar nutritivo (AN) y se incubaron a 28 ± 2 °C por 72 h.

Los aislamientos de *Bacillus* spp y de *Pseudomonas* sp se identificaron molecularmente con base en la secuenciación del gen 16S del DNAr. Los genes se amplificaron con el uso de un termociclador Verity para PCR de punto final (Applied Biosystems) (Jang- Jih *et al.*, 2000) en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) ubicado en San Luis Potosí, México. Adicionalmente las especies ya habían sido caracterizadas morfológicamente al microscopio compuesto y por pruebas bioquímicas.

El aislamiento de los fitopatógenos se realizó de muestras de plántulas de chile serrano de 30 días de cultivo, con síntomas de “Damping off” y procedentes de invernaderos de la región agrícola de Parras de la Fuente, Coahuila, México, durante el verano del año 2019. Para el aislamiento de los hongos fitopatógenos, se eliminó los residuos de sustrato del cepellón, se lavó la planta completa con agua potable en condiciones asépticas, se cortaron pequeños trozos de raíces y tallos con bisturí estéril y se desinfectaron en una solución de NaClO al 1 % por 3 min,

se lavó por tres ocasiones con agua destilada estéril por 1.30 min y se dejó secar dentro de una campana de flujo laminar sobre papel estroza estéril. Una vez secos se transfirieron a cajas Petri con Medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) o V8-Agar (V8-A) y se incubaron a 26 ± 2 °C por 3 días, al observar crecimiento de micelio, este se transfirió a Agar Agua (AA) por 48 horas y se purifico por punta de hifa en cajas Petri con PDA y V8-A.

Prueba de patogenicidad

Se utilizó la técnica empleada por Sánchez *et al.* (1975) y modificada por Espinoza-Ahumada *et al.* (2019), para ello se germinaron en medio AA 50 semillas de chile híbrido Platino, que se desinfectaron por 3 min en una solución de NaClO al 1 % y lavaron en agua destilada estéril en tres ocasiones. A los 5 días después de la siembra, una vez que desarrollaron el hipocótilo, se transfirieron en grupos de tres semillas a cajas Petri con medio de cultivo AA, cuando se observó el desarrollo de raíz y cotiledones (dos días después), se inoculó en el centro de las cajas Petri un explante de cultivo de 3 mm de diámetro con micelio del fitopatógeno purificado. Las cajas Petri se incubaron a 26 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad). Para determinar la patogenicidad se evaluó la mortalidad de las plántulas, por nueve días, para ello se utilizó una escala visual de severidad descrita por Apodaca *et al.* (2004) con modificaciones, donde; 0 = sin síntomas planta sana, 1 = puntos pequeños necróticos en la raíz o en cotiledones, 2 = necrosamiento en la base de la raíz, 3 = raíz necrosada hasta en un 50 %, 4 = raíz o planta completamente necrosada. Los datos obtenidos se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) para estratificar los tratamientos a través de una comparación de medias por Tukey ($p \leq 0.05$) y bajo un diseño completamente al azar con dos tratamientos (1 = *Pythium aphanidermatum*, 2 = *Fusarium oxysporum*), un testigo absoluto y tres repeticiones.

Determinación del antagonismo *In vitro*

Este se realizó mediante la técnica de confrontación dual entre antagonista y fitopatógeno en placas con Agar Nutritivo Caldo de Papa (ANCP), para ello las cajas fueron marcadas en cuatro puntos equidistantes cardinales, en cada uno se colocó una asada de cada cepa antagonista, después de 24 o 72 horas se colocó un explante en forma de disco con micelio de cada fitopatógeno por separado y se incubaron a 26 ± 2 °C, hasta que el micelio del testigo lleno por completo la caja de cultivo. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con 4 tratamientos (B15, BITV, BIBT y Pd) y un testigo, con 4 repeticiones por tratamiento para cada fitopatógeno (*Fusarium* y *Pythium*). Se midió el crecimiento radial del fitopatógeno (mm) en confrontación con cada cepa bacteriana, este se transformó a porcentaje de inhibición (%I), usando la formula $\%I = (C-T)/C \times 100$ descrita por Castillo- Reyes *et al.* (2015), donde C es el diámetro del testigo y T es el tratamiento. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa estadístico InfoStat versión 2019.1.2.0.

Resultados y Discusión

Identificación y caracterización de *Bacillus* spp y *Pseudomonas* sp

Las especies bacterianas se identificaron con base a su secuenciación del gen 16S del rRNA. Las especies del género *Bacillus* denominadas B15, BITV y BIBT mostraron una similitud del 91.91, 98.36 y 96.15 % con la especie *B. subtilis* con claves de acceso al genbank de MK616213.1, MH619505.1 y KY010584.1 respectivamente. Aunque la cepa B15 coincide con un porcentaje del 91.91 % con la especie *B. subtilis* este porcentaje se considera bajo, además, esta cepa en estudios anteriores presentó un porcentaje más alto (94.12 %) de similitud con la especie *Bacillus pumilus* al realizársele pruebas morfológicas y bioquímicas (Ordaz, 2004), por lo que la identificación morfológica y bioquímica es más aceptable. Las tres cepas (B15, BITV y BIBT) presentaron forma típica de bacilo doble con producción de endospora (Figura 1A, B y C), tinción Gram+ y catalasa positiva (Sosa et al., 2005).

Por su parte la bacteria del género *Pseudomonas* mostró una similitud de un 96.12 % con la especie *Pseudomonas donghuensis* con clave de acceso MK883145.1. Dicha bacteria aislada de raíz de *M. macroura* y por siembra en estría en Agar fosfatos (NBRIIP) (Flores et al., 2014) presentó formación de colonia amarilla translúcida característica del género *Pseudomonas* spp. Al inicio el aislamiento presentó irregularidad para solubilizar el fosfato tricalcico. Esta bacteria se presentó en forma de bacilo vegetativo individual o en pares, no esporulada (Figura 1D), Gram- (Figura 1E) con flagelos polares y catalasa positiva. En AN a las 48h de incubación sus colonias generan un pigmento amarillo (Figura 1F), mientras en medio King B no producen fluorescencia y sus colonias muestran bordes irregulares. Gao et al. (2012) reportaron por primera vez a esta especie de *Pseudomonas* la cual denominaron como *Pseudomonas* HYS, posteriormente, Gao et al. (2015) la clasificaron como una nueva especie la cual denominaron *P. donghuensis* aislada de agua del Lago Donghu de Wuhan en China, otros investigadores reportan su aislamiento de la rizosfera de tomate (Ossowicki et al., 2017), algodón (Tao et al., 2020) y suelo agrícola (Ágaras et al., 2018). Las características presentadas por *P. donghuensis* aislada en esta investigación son similares a las descritas por Ágaras et al. (2018) para la especie *P. donghuensis* SVBP6, pero diferentes a las reportadas por Gao et al. (2015) los cuales señalan que *P. donghuensis* HYS desarrolla fluorescencia en agar King A y B, mientras que nuestra cepa no produjo fluorescencia en medio King B al igual que la reportada por Ágaras et al. (2018).

Identificación de las especies causantes de “Damping off”

De las plántulas de chile se aisló un hongo y un oomiceto responsables de “Damping off”. El hongo fitopatogénico mostró hifas septadas, clamidosporas globosas (Figura 2Aa), fialides cortas (Figura 2Ab) donde se insertan microconidias bicelulares en forma de riñón (Figura 2Ba), macroconidias curvas en forma de canoa de tres (Figura 2Bb y Cb) o cuatro septas (Figura 2Ca), con célula pie (Figura 2Bc), además de la formación de esporodoquio (Figura 2D). Estas características morfológicas microscópicas observadas correspondieron al género *F. oxysporum* según las claves taxonómicas especializadas de Leslie y Summerell (2006).

La identificación y reporte del oomyceto correspondió a *Pythium aphanidermatum*, dicho trabajo se publicó anteriormente a esta investigación y se reporta como una cepa agresiva y de crecimiento rápido para provocar "Damping off" (Jiménez-Pérez *et al.*, 2022). Se comprobó que las hifas fueron toruloides cenocíticas (Figura 3Aa), oogonios terminales esféricos lisos (Figura 3Aa, Ba), oósporas apleróticas (Figura 3Bb), anteridios diclinos o monoclinos (Figura 3Ac, Bc), y esporangios filamentosos e irregulares (Figura 3Ca), tal y como se observan en la Figura 3 (Van der Plaats-Niterink, 1981; Watanabe, 2010; Jiménez-Pérez *et al.*, 2022).

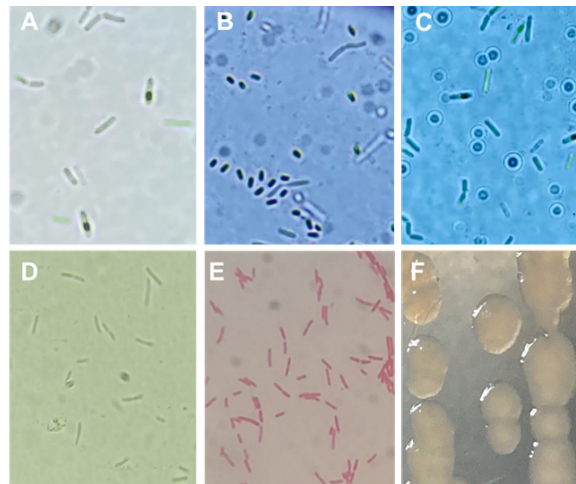


Figura 1. Características morfológicas de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas donghuensis*. A, B y C) células vegetativas y producción de endoesporas de *B. subtilis* (A- B15, B- BITV y C- BIBT). D) *P. donghuensis* células vegetativas, E) tinción Gram. F) colonia bacteriana en medio de cultivo AN.

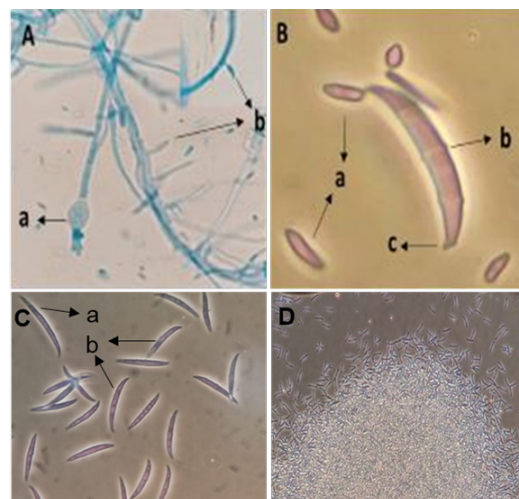


Figura 2. Observación microscópica de *Fusarium oxysporum*. A) a- Clamidospora globosa y b- Fialides, B) a- Microconidias, b- Macroconidia de 3 septos y c- célula pie. C) a- Macroconidias de 4 septos y b- de 3 septos. D) Esporodocio.



Figura 3. Observación microscópica de *P. aphanidermatum*. A) a- hifas toruloides cenocíticas, b- oogonio y c- anteridio, B) a- oogonio, b- oóspora aplerotica y c- anteridio. C) a- esporangios.

Prueba patogenicidad

En la prueba de patogenicidad, las plántulas chile inoculadas con explante de cultivo con micelio de *F. oxysporum* (Figura 4B) a los cuatro ddi causaron puntos necróticos en la raíz, que se desarrollaron y crecieron hasta necrosar por completo las plántulas a los nueve ddi, además, se detectó crecimiento abundante de micelio blanco que cubría por completo a las plántulas, por lo cual ocasiono el 100 % de la mortalidad de las plántulas (Figura 4E). En plántulas de chile inoculadas con *P. aphanidermatum* (Figura 4C), a los tres ddi mostraron necrosis, raíces colonizadas por micelio, los cotiledones con manchas necróticas y a los cinco ddi las plántulas mostraron abundante crecimiento de micelio, ocasionando el 100 % de la mortalidad de las plántulas (Figura 4F). En testigos se observó crecimiento de raíz, tallo y cotiledones normal, sin signos o síntomas de necrosis (Figura 4A-D). De acuerdo a la escala de severidad de Apodaca *et al.* (2004) el nivel de daño observado en los cotiledones, hipocótilo y raíz de las plántulas inoculadas con *P. aphanidermatum* y *F. oxysporum* es del más alto nivel (4), ya que fueron causantes la muerte de las plántulas, mientras que en los testigos no hubo daños. Por ello se comprueba que las especies *P. aphanidermatum* y *F. oxysporum* fueron agentes causales del “Damping off” y muerte de plántulas de chile.

Los resultados de este estudio coinciden con los reportes de otros autores, sobre la capacidad de estos fitopatógenos para causar “Damping off”, como Gravel *et al.* (2005) que reportaron a *P. aphanidermatum* y *P. ultimum* como agentes etiológicos del “Damping off” y pudrición de semillas en plántulas de tomate, al igual que González *et al.* (2013), que reportan a los fitopatógenos *Pythium* y *Fusarium* en almácigos de tomate. Mientras que Sánchez *et al.* (2015) reportan a *F. oxysporum* como agente causal del “Damping off” en almácigos de cebollas. De manera similar Rivera-Jiménez *et al.* (2018) reportaron que *F. oxysporum* causó la muerte de un 49.54 % de plántulas de chile poblano en 30 días de la prueba en condiciones de invernadero, en contraste con este trabajo que se realizó en condiciones *in vitro* y donde provocó una mayor mortalidad de plántulas en menor tiempo (9ddi).

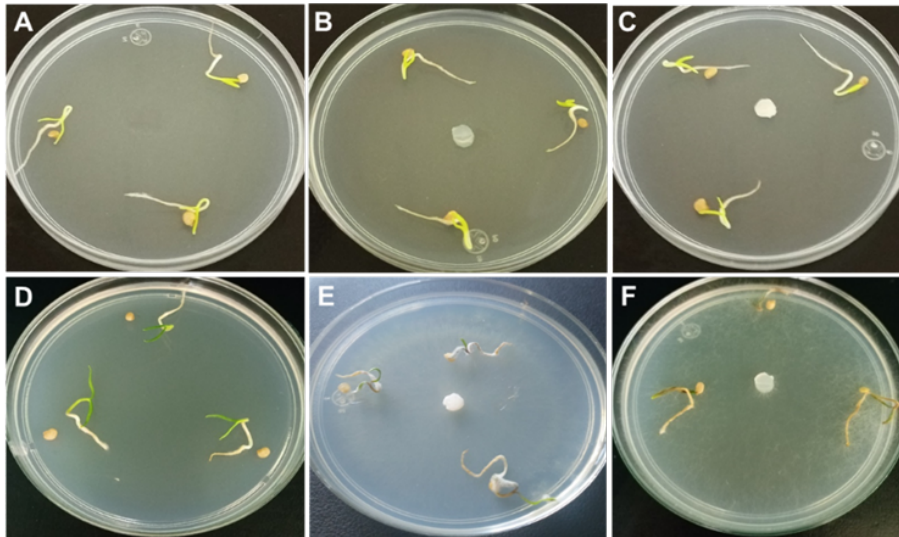


Figura 4. Prueba de patogenicidad. A) Tratamiento testigo. B) Tratamiento inoculado con *F. oxysporum*. C) Tratamiento inoculado con *P. aphanidermatum*. D) Tratamiento testigo a los nueve ddi. E) Tratamiento inoculado con *F. oxysporum* a los nueve ddi. F) Tratamiento inoculados con *P. aphanidermatum* a los cinco ddi.

Determinación del antagonismo *In vitro*

En las confrontaciones de *F. oxysporum* con cepas de *Bacillus subtilis* y *P. donghuensis*, se encontró diferencia estadística significativa ($p \leq 0,05$) en el porcentaje de inhibición. Todas las cepas de *Bacillus* mostraron capacidad inhibitoria, siendo *B. subtilis* (BITV) la de mayor eficiencia para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, en un 56.24 % (Fig. 5- C), seguida de *B. subtilis* (BIBT) con 49.62 % (Figura 5A) y el aislado de *B. subtilis* (B15) con la menor inhibición (39.35 %) (Figura 5B). La cepa de *P. donghuensis* (Pd) no inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* (Figura 5D) durante los seis días que duró el experimento, tiempo que tardó el testigo en crecer en toda la placa de cultivo (Figura 5E) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición *in vitro* de los tratamientos contra *Fusarium oxysporum* a los seis días de la confrontación.

Tratamientos		Medias
Cepa	Clave	
<i>Bacillus subtilis</i>	BITV	56.24A
<i>Bacillus subtilis</i>	BIBT	49.62B
<i>Bacillus subtilis</i>	B15	39.35C
<i>Pseudomonas donghuensis</i>	Pd	0.00D
Testigo	Testigo	0.00D

*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

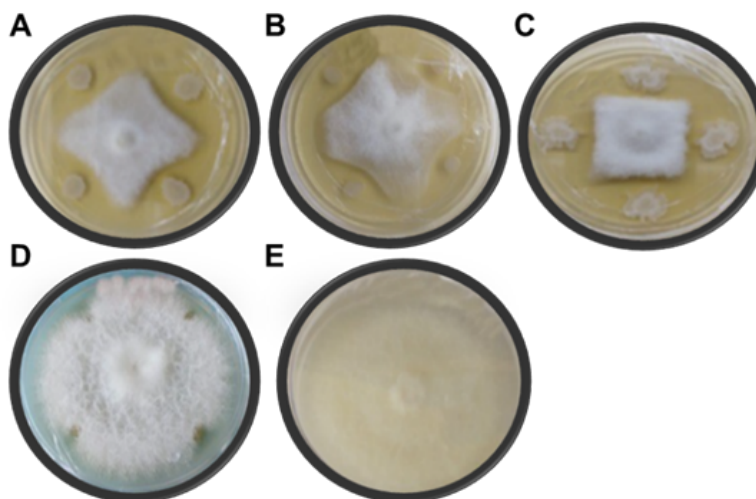


Figura 5. Antagonismo *in vitro* de las diferentes cepas de *Bacillus* spp., en contra de *F. oxysporum* a los seis días de confrontación en comparación con el testigo. A) BIBT, B) B15, C) BITV, D) Pd. y E) Testigo.

Para las confrontaciones contra *P. aphanidermatum* los tratamientos se realizaron 72 horas antes de inocular el fitopatógeno, pues este oomiceto mostró un crecimiento micelial muy rápido al desarrollarse en toda la caja de cultivo en solo 32 horas de incubación (Figura 6E). A diferencia del ensayo de *F. oxysporum* ninguna de las cepas de *B. subtilis* mostró inhibición contra este oomiceto (Figura 6A-C), solo la cepa de *P. donghuensis* inhibió en un 56 % el crecimiento micelial del *P. aphanidermatum* (Figura 6D) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición *in vitro* de los diferentes tratamientos contra *Pythium aphanidermatum* a las 32 horas de la confrontación.

Tratamientos		Medias
Cepa	Clave	
<i>Pseudomonas donghuensis</i>	Pd	56.00A
<i>Bacillus subtilis</i>	BITV	0.00B
<i>Bacillus subtilis</i>	BIBT	0.00B
<i>Bacillus subtilis</i>	B15	0.00B
Testigo	Testigo	0.00B

*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

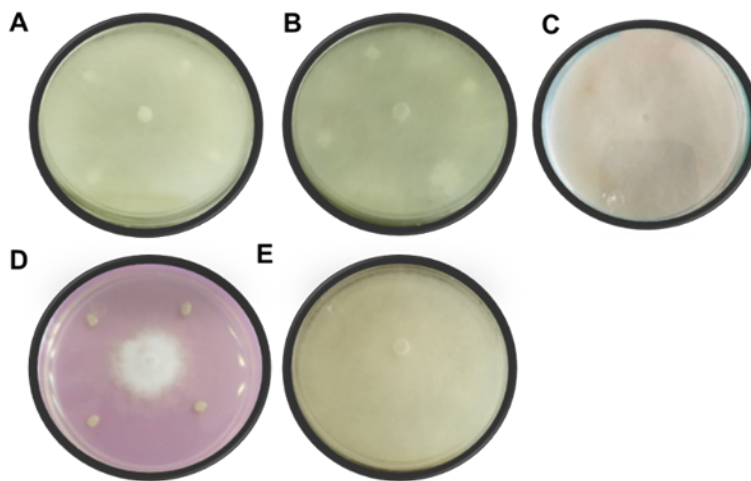


Figura 6. Antagonismo *in vitro* de las diferentes cepas contra *P. aphanidermatum* a las 32 horas después de la confrontación. A) BIBT, B) BITV, C) B15, D) Pd, y E) Testigo.

Existen diversos estudios que demuestran la capacidad antagónica del género *B. subtilis* en contra de diversos fitopatógenos, por ejemplo, Mejía- Bautista *et al.* (2016) reportan rangos de inhibición variados (21.28- 71.70 %) en contra de dos cepas de *Fusarium* (*F. equiseti* y *F. solani*) en confrontación con 10 cepas de *Bacillus* spp (4- *B. subtilis*, 1- *B. cerus*, 1- *B. amyloliquefaciens* y 4- *Bacillus* spp) siendo las cepas de *B. subtilis* CBMT51 y CBRF8 las de mayor actividad inhibitoria con porcentajes de inhibición del 71.70 % y 69.92 % en contra de *F. equiseti* y *F. solani* respectivamente, mientras que en esta investigación se obtuvieron rangos de inhibición del

39.35 al 56.24 % con las tres cepas de *Bacillus* en contra de *F. oxysporum*. Khedher *et al.* (2020) reportaron la inhibición de *F. oxysporum* del 54.7 % utilizando a *B. subtilis*, siendo este resultado similar al obtenido en este trabajo (56.24 %) utilizando la cepa de *B. subtilis* (BITV). Por su parte Sosa *et al.* (2005) confrontando 17 cepas de *Bacillus* spp, demostraron su capacidad inhibitoria en contra de diversos fitopatógenos, siendo *P. aphanidermatum* uno de ellos, contrastando con nuestra investigación donde ninguna de las tres cepas de *Bacillus* logro inhibir al oomyceto a las 32 h que duro el experimento a diferencia del trabajo de Sosa *et al.* (2005) el cual la cepa de *P. aphanidermatum* presento un crecimiento lento de 72 h para llenar la caja Petri. Algunos autores mencionan que la inhibición generada por *Bacillus* spp se debe a la capacidad de síntesis de algunos antibioticos (Iturina A y surfactina) y enzimas líticas (Asaka & Shoda, 1996; Sosa *et al.*, 2005)

Los resultados obtenidos con *P. donghuensis* respaldan lo propuesto por Gao *et al.* (2015) quienes sugieren a esta especie como candidata para control biológico por su alta capacidad de síntesis de sideroforos, la cual es mayor que otras cepas (Gao *et al.*, 2012). Existen reportes del antagonismo de *P. donghuensis* en contra de algunos fitopatógenos, por ejemplo, Ossowicki *et al.* (2017) reportan la inhibición del crecimiento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae* y *Pythium ultimum* con la cepa de *P. donghuensis* P482. Esta misma cepa (P482) también demostró tener efectividad contra bacterias como; *Dickeya solani* y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Matuszewska *et al.*, 2021). Tao *et al.* (2020) inhibieron a *V. dahliae* con la cepa *P. donghuensis* 22G5. De manera similar, Muzio *et al.* (2020) reportaron la inhibición de *Macrophomina phaseolina* por *P. donghuensis* SVBP6. Los autores citados atribuyen la capacidad antagonista de *P. donghuensis* a su alta capacidad de síntesis sideroforos especialmente del 7-hidroxitropolona un sideróforo no fluorescente, no reportado en otras especies de *Pseudomonas*. En la actualidad aún son pocos los estudios realizados con esta especie de *Pseudomonas* en contra de hongos fitopatógenos, teniéndose solamente reportes con las cepas mencionadas anteriormente denominadas P482, 22G5 y SVBP6, tal es el caso que en la actualidad no se encuentran resultados de una cepa de *P. donghuensis* capaz de inhibir a *P. aphanidermatum* y sin actividad inhibitoria en contra de *F. oxysporum* como se demostrado en este trabajo.

Conclusiones

Se confirma como agentes causales de “Damping off” a los géneros *F. oxysporum* y *P. aphanidermatum* aislados de plántulas de chile con síntomas de la enfermedad y comprobada su patogenicidad.

El efecto inhibitorio de las bacterias antagónicas depende de la especie y del tipo de fitopatógeno contra el que se confronte, ya que los aislamientos de *B. subtilis* tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium*, pero no el de *Pythium*, y en contraste *P. donghuensis* que inhibió al oomyceto, pero no al deuteromyceto. Debido a lo cual para futuros experimentos se proyecta usar mezclas de ambos antagonistas formulados para un control más eficiente del “Damping off”.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo y administrador del proyecto, Gabriel Gallegos Morales (autor 2), desarrollo de la metodología y validación experimental, Omar Jiménez Pérez (autor 1), manejo de software y Manejo de datos, Epifanio Castro del Ángel (autor 5); análisis de resultados, Cesar Espinoza Ahumada (autor 4); escritura y preparación del manuscrito, Juan Manuel Sánchez Yañez (autor 6); y Fco. Daniel Hernández Castillo (autor 3): revisor critico final del artículo y especialista en la caracterización morfológica de hongos fitopatógenos.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, con número de proyecto 2474 y CONACYT en su programa de becas de postgrado en Parasitología Agrícola.

Declaraciones éticas

La información presentada fue expuesta ante la academia del postgrado como parte de los avances de tesis de la Maestría en Parasitología Agrícola.

Declaración de consentimiento informado

No aplica.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para realizar los estudios de posgrado.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias

- Ágaras, B. C., Iriarte, A., & Valverde, C. F. (2018). Genomic insights into the broad antifungal activity, plant-probiotic properties, and their regulation, in *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. PLOS ONE, 13(3), e0194088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194088>
- Apodaca, S. M. A., Zavaleta M. E., Osada K. S., García, E. R., & Valenzuela, U. J. G. (2004). Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1), 22-29. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222104>

- Asaka, O., & Shoda, M. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4081-4085. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4081-4085.1996>
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200709342015000300009&lng=es&tlng=es
- Chirino- Valle, I., Kandula, D., Littejohn, C., Hill, R., Wlaker, M. Shields, M., Cummings, N., Heittiarachchi, D. & Wratten, S. (2016). Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-services provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. *Scientific Reports*, 6(25109), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep25109>
- Espinoza-Ahumada, C. A., Gallegos-Morales, G., Ochoa-Fuentes, Y. M., Hernández-Castillo, F. D., Méndez-Aguilar, R., & Rodríguez-Guerra, R. (2019). Antagonistas microbianos para biocontrol de la marchitez y su efecto promotor en el rendimiento de chile serrano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(23), 187-197. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2020>
- Flores, G. A. C., González, V. V. M., Aguilar, G. C. N., & Herrera, R. R. (2014). Biofertilizantes microbianos. *Plaza y Valdés, S.A de C.V.*, 1, 139- 162.
- Gao, J., Yu, X., & Xie, Z. (2012). Draft genome sequence of high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS. *Journal of Bacteriology*, 194, 4121–4121. <https://doi.org/10.1128/JB.00688-12>
- Gao, J., Xie, G., Peng, F., & Xie, Z. (2015). *Pseudomonas donghuensis* sp. nov., exhibiting high-yields of siderophore. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 83–94. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0306-1>
- González, A. A., Mateos R. R. A., López M. M., Hernández S. M. de la L., & González C. A. (2013). Alternativas para el manejo de Damping off en plántulas de tomate *Lycopersicum esculentum* Mill (L, 1753) (Solanales: Solanaceae). *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.47808/revistabiologia.v1i1.211>
- Gravel, V., Martinez, C., Antoun, H., & Tweddell, R. J. (2005). Antagonist microorganisms with the ability to control *Pythium* Damping-off of tomato seeds in rockwool. *BioControl*, 50(5), 771-786. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-1312-z>
- Hernández-Hernández, E. J., Hernández-Ríos, I., Almaraz-Suarez, J. J., López-López, A., Torres-Aquino, M., & Morales F. F. J. (2018). Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del damping off en chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), 525-537. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.335>
- Jang- Jih, L., Chheng-Lih, P., Shih- Yi, L., & Chih-Chieng, W. (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2076-2080. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.6.2076-2080.2000>
- Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F. D., Cepeda-Siller, M., & Espinoza-Ahumada, C. A. (2022). Characterization and pathogenicity of a *Pythium aphanidermatum* isolate causing ‘damping off’ in pepper seedlings. *Mexican Journal of Phytopathology*, 40(1), 116- 130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-3>
- Khedher, S. B., Mejdoub-Trabelsi, B., & Tounsi, S. (2020). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, 152, 104444. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>

- Larios, L. E. J., Valdovinos, N. J. J. W., Chan, C. W., García, L. F. A., Manzo, S. G., & Buenrostro, N. M. T. (2019). Biocontrol de Damping off y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq) con *Trichoderma* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 471-483. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v10i3.332>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium burkinafaso. Laboratory manual*. Blackwell Publishing, State Avenue, Ames, Iowa, 212- 218.
- Matuszewska, M., Maciąg, T., Rajewska, M., Wierzbicka, A., & Jafra, S. (2021). The carbon source-dependent pattern of antimicrobial activity and gene expression in *Pseudomonas donghuensis* P482. *Scientific Reports*, 11(10994). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90488-w>
- Mejía- Bautista, M. Á., Reyes- Ramírez, A., Cristóbal- Alejo, J., Tun- Suárez, J. M., Borges- Gómez, L. C., & Pacheco- Aguilar, J. R. (2016). *Bacillus* spp. in the Control of Wilt Caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(3), 208-222. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1>
- Muzio, F. M., Agaras, B. C., Masi, M., Tuzi, A., Evidente, A., & Valverde, C. (2020). 7-hydroxytropolone is the main metabolite responsible for the fungal antagonism of *Pseudomonas donghuensis* strain SVBP6. *Environmental Microbiology*. 22(7), 2550-2563. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14925>
- Ordaz, S. S. (2004). Control Microbiano mediante bacterias esporuladas de la costra negra de la papa (*Rhizoctonia solani* Kühn) en invernadero. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Ossowicki A., Jafra S., & Garbeva P. (2017). The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLOS ONE* 12(3), e0174362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174362>
- Revelés-Hernández, M., Huchín-Alarcón, S., Velásquez-Valle, R., Trejo-Calzada, R., & Ruíz-Torres, J. (2010). Producción de plántula de chile en invernadero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Valle del Guadiana. Folleto Técnico Núm. 41. CIRNOC- INIFAP, 40. <https://hopelchen.tecnm.mx/principalsylabus/fpdb/recursos/r125647.PDF>
- Rivera-Jiménez, M. N., Zavaleta-Mancera, H.A., Rebollar-Alviter, A., Aguilar-Rincón, V.H., García-de-los-Santos, G., Vaquera-Huerta, H., & Silva-Rojas, H.V. (2018). Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of ‘Poblano’ pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycological Progress*, 17(11), 1237-1249. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1441-2>
- Sánchez, L. E., Endo, R. M., & Leary, J. V. (1975). A rapid technique for identifying the clones of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causing crown and root rot of tomato. *Phytopathology*. 65(6):726-727. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1975Articles/Phyto65n06_726.PDF
- Sánchez, A. D., Barrera, V., Reybet, G. E., & Sosa, M. C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 114 (1), 61-70. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/47308>
- Sivasakthi, S., Usharani, G., & Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16), 1265-1277. <http://www.labamerex.com/images/nov028/2014-Biocontrol-Potencialidad-de-Bacillus-Pseudomonas.pdf>
- Sosa, L. A. I., Pazos, V., & Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco.

- Centro Agrícola*, 32 (3), 25-29. http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V32-Numero_3/cag05_3051434.pdf
- Tao, X., Zhang, H., Gao, M., Li, M., Zhao T., & Guan, X. (2020). *Pseudomonas* species isolated via high-throughput screening significantly protect cotton plants against *Verticillium* wilt. *AMB Express*, 10(193), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01132-1>
- Watanabe, T. (2010). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRC Press Taylor & Francis, *Group Boca Raton London New York*, 26-68. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804193>
- Van der Plaats-Niterink, A. J. (1981). Monograph of the Genus *Pythium*. *Studies in Mycology*,(21). <https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim21/full%20text.htm>