

# Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*

## Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*

Nancy Ley-López, Isidro Márquez-Zequera, José Armando Carrillo-Fasio, Josefina León-Félix, Isabel Cruz-Lachica, Raymundo Saúl García-Estrada\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán. Km 5.5 Carretera Culiacán-El Dorado, Campo El Diez, CP. 80110. Culiacán, Sinaloa, México; Raúl Allende-Molar, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Carretera Tuxpan-Tampico km. 7.5 Tuxpan, Veracruz, México. \*Autor para correspondencia: rsgarcia@ciad.mx.

Recibido: 07 de Noviembre, 2017.

Aceptado: 04 de Febrero, 2018.

Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS, Allende-Molar R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-2

Primera publicación DOI: 06 de Marzo, 2018.

First DOI publication: March 06, 2018.

**Resumen.** El oomiceto *Phytophthora capsici* es un patógeno de importancia económica en los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de inhibición germinativa y biocontrol de dos aislados del género *Bacillus* sobre zoosporas de *P. capsici*. Los aislados fueron identificados como *Bacillus amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. En las pruebas *in vitro* de la germinación de zoosporas de *P. capsici*, los porcentajes de inhibición con suspensión celular

**Abstract.** The oomycete *Phytophthora capsici* is a pathogen of economic importance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and chili (*Capsicum annuum* L.) crops. The objective of this work was to evaluate the effect of germinative inhibition and biocontrol of two isolates of the genus *Bacillus* on zoospores of *P. capsici*. The isolates were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*. In the *in vitro* tests of the germination of zoospores of *P. capsici*, the percentages of inhibition with cell suspension of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* were significant with 88.15 and 97.05% respectively, while, the filtrates showed 24.30% of inhibition. In the *in vivo* study, tomato seedlings treated with cell suspension of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, showed lower severity of the disease caused by *P. capsici* with 22.22 and 27.78% respectively, compared to that observed in chili seedlings where values of 61% were obtained. The tomato and chili seedlings treated with bacterial filtrates showed up to 94% severity. With cell suspension of *B. amyloliquefaciens* and

de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* fueron significativos con 88.15 y 97.05% respectivamente, mientras que, los filtrados mostraron el 24.30% de inhibición. En el estudio *in vivo*, las plántulas de tomate tratadas con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, mostraron menor severidad de la enfermedad ocasionada por *P. capsici* con 22.22 y 27.78% respectivamente, respecto a lo observado en plántulas de chile donde se obtuvo valores de 61%. Las plántulas de tomate y chile tratadas con filtrados bacterianos, mostraron hasta 94% de severidad. Con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* la eficacia de biocontrol fue 72 y 77% respectivamente, lo cual muestra que estos microorganismos pueden ser usados como agentes de biocontrol de *P. capsici* en plantas de tomate y chile.

**Palabras clave:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, fitopatógenos, oomiceto.

Los cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) son de importancia económica por su consumo en la dieta humana. México se posiciona en el décimo lugar en producción de tomate con 2,649,358 t y segundo lugar en chile, con una producción de 2,294,400 t (SIAP 2016). Sin embargo, la producción de ambos cultivos es afectada por enfermedades ocasionadas por diferentes patógenos; entre éstos, destaca el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian, el cual es un microorganismo fitopatógeno que causa serios daños económicos en la agricultura en todo el mundo (Chen *et al.*, 2016a). *P. capsici* ocasiona “damping-off”, pudrición de raíz, daño en tallo, hoja o pudrición de frutos en más de 50 especies de plantas hospedantes (Erwin y Riveiro, 1996; Khan *et al.*, 2011). Se ha reportado que este patógeno causa considerables pérdidas de rendimiento en

*B. thuringiensis* the efficiency of biocontrol was 72 and 77% respectively, which show that these microorganisms can be used as biocontrol agents of *P. capsici* in tomato and chili plants.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, phytopathogens, oomycete.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and chili (*Capsicum annuum* L.) are economically important crops because of their high consumption in the human diet. Mexico ranks tenth in tomato production with 2,649,358 t and second in chili production with 2,294,400 t (SIAP 2016). However, the production of both crops is affected by diseases caused by different pathogens, the most important being the oomycete *Phytophthora capsici* Leonian, which causes serious economic damage to agriculture worldwide (Chen *et al.*, 2016a). *Phytophthora capsici* causes “damping-off”, root rot, stem and leaf damage or fruit rot in more than 50 host plant species (Erwin and Riveiro, 1996; Khan *et al.*, 2011). The pathogen has been reported to cause considerable yield losses (15 to 45%), and even total chili, tomato and eggplant crop losses (González *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). The high soil moisture levels and warm weather that prevail in tomato and chili farms favor the spread and survival of *P. capsici* (Erwin and Riveiro, 1996).

Several strategies have been used to manage and control the pathogen, including cultural practices, resistant varieties (Yang *et al.*, 2015; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017), fungicide applications (Lamour *et al.*, 2012) and water management (Sanogo y Ji, 2013), but none of them individually have completely controlled the pathogen (Hausbeck and Lamour, 2004). Although several specific fungicides have quickly and effectively reduced disease severity, their indiscriminate use

la producción en un rango del 15 al 45% e incluso pérdida total de los cultivos de chile, tomate y berenjena (González *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011). La alta humedad en el suelo y clima cálido que prevalece dentro de las plantaciones de tomate y chile, favorecen la dispersión y la sobrevivencia de *P. capsici* (Erwin y Riveiro, 1996).

En el manejo y control de este patógeno se han utilizado varias estrategias, incluyendo prácticas culturales, utilización de variedades resistentes (Yang *et al.*, 2015; Gómez-Rodríguez *et al.*, 2017), aplicación de fungicidas (Lamour *et al.*, 2012) y manejo del agua (Sanogo y Ji, 2013), pero ninguna de estas prácticas de manera individual ha logrado controlar al patógeno por completo (Hausbeck y Lamour, 2004). Aunque algunos fungicidas específicos han logrado reducir la severidad de la enfermedad en forma rápida y efectiva, su uso indiscriminado ha ocasionado la aparición de cepas resistentes y contaminación al ambiente (Qi *et al.*, 2012). Por lo anteriormente señalado, en la actualidad para el manejo de *Phytophthora* se han considerado nuevas alternativas, basadas en el control biológico, estrategia importante en el manejo de fitopatógenos que habitan en el suelo, ya que reducen la aplicación de agroquímicos (Nguyen *et al.*, 2012; Rios-Velasco *et al.*, 2016).

Distintos microorganismos han sido reportados por suprimir el crecimiento de *P. capsici*, incluyendo *Streptomyces* spp. (Ko *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), *Paenibacillus* spp. (Naing *et al.*, 2014), *Trichoderma* sp. (Segarra *et al.*, 2013), *Clitocybe nuda* (Chen *et al.*, 2012) *Aspergillus* sp. (Kang y Kim, 2004) y *Bacillus* spp. (Zhang *et al.*, 2010). El género *Bacillus* ha sido más estudiado dentro del control biológico y las especies de este género se consideran candidatos ideales para el control de enfermedades, debido a su potencial antagónica (Zhao *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016). Los mecanismos de control incluyen la producción de

has led to the emergence of resistant isolates and environmental pollution (Qi *et al.*, 2012). For this reason, new alternatives based on biological control are being considered for managing *Phytophthora*, an important strategy in soil-borne phytopathogen management, since they reduce the application of agrochemicals (Nguyen *et al.*, 2012; Rios-Velasco *et al.*, 2016).

Different microorganisms have been reported to suppress *P. capsici* growth, including *Streptomyces* spp. (Ko *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2012), *Paenibacillus* spp. (Naing *et al.*, 2014), *Trichoderma* sp. (Segarra *et al.*, 2013), *Clitocybe nuda* (Chen *et al.*, 2012) *Aspergillus* sp. (Kang and Kim, 2004) and *Bacillus* spp. (Zhang *et al.*, 2010). The *Bacillus* genus has been studied more as part of biological control, and species of this genus are considered ideal candidates for controlling diseases due to their antagonistic potential (Zhao *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2016). Control mechanisms include the production of antibiotic and lytic enzymes, physical and chemical interference, competition, host resistance induction, hyperparasitism and predation (Pal and Gardener, 2006).

The objectives of the present study were to determine how *Bacillus* spp. affects germinative inhibition by using cells and bacterial filtrates *in vitro* on *P. capsici* zoospores and they can be used as biocontrol, in tomato and chili plants, as well as to identify those microorganisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The microorganisms used in this study were two antagonistic bacterial isolates of the *Bacillus* genus coded as B17 and B32, and a *Phytophthora capsici* isolate from the isolate pool at the Phytopathology

antibióticos y enzimas líticas, interferencia física o química, competencia, inducción de resistencia al hospedero, hiperparasitismo y predación (Pal y Gardener, 2006).

Los objetivos de este trabajo fueron, determinar el efecto de inhibición germinativa de *Bacillus* spp. mediante el uso de células y filtrados bacterianos sobre zoosporas de *P. capsici* a nivel *in vitro*, y su biocontrol en plantas de tomate y chile; así como la identificación de estos microorganismos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron, dos aislados bacterianos antagonistas del género *Bacillus* codificados como B17 y B32 y la cepa *Phytophthora capsici* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Las bacterias fueron aisladas de la rizósfera de campos agrícolas con cultivos de tomate y chile en distintas localidades geográficas de Sinaloa, se activaron en agar nutritivo (AN), se incubaron a 27 °C durante cinco días y se preservaron en buffer de fosfato a 4 °C hasta su uso. El patógeno *Phytophthora capsici*, se activó en medio de cultivo V8 (10% de jugo V8, 0.02% CaCO<sub>3</sub> y 1.5% agar) y se incubó a 27 °C hasta su uso (Chen *et al.*, 2016b).

### Identificación morfológica y molecular

Para confirmar que los aislados bacterianos en estudio pertenecieran al género *Bacillus*, se identificaron mediante morfología de las colonias, célula, tinción Gram y tinción de flagelos (Castillo *et al.*,

Laboratory of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Bacteria were isolated from the rhizosphere of tomato and chili crops at different geographical locations in Sinaloa, activated in nutrient agar (NA), incubated at 27°C for five days and preserved in a phosphate buffer at 4°C until they were used. The *Phytophthora capsici* pathogen was activated in V8 culture medium (10% V8 juice, 0.02% CaCO<sub>3</sub> and 1.5% agar) and incubated at 27°C until it was used (Chen *et al.*, 2016b).

### Morphological and molecular identification

To confirm that the bacterial isolates belonged to the *Bacillus* genus, they were identified through colony morphology, cell, and Gram and flagella stains (Castillo *et al.*, 2004), as well as molecular techniques in the Phytopathology Laboratory of CIAD Unidad Culiacán and Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) at CINVESTAV's campus in Irapuato, Guanajuato, Mexico.

A purified colony with around 48-72 h of growth was used to identify the bacterial isolates. DNA extraction was carried out following the methodology of Heddi *et al.* (1999). Later, the 16S gene from DNAr was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) technique and FD2 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and RP1 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACC-3') universal primers that amplify a 1500 pb fragment. The amplification was performed in a Thermocycler 100 Thermal Cycler™ (Singapore). The time and temperature conditions were as follows: first, the enzyme was activated at 95 °C for 5 min, a second step consisted of 30 cycles including denaturation at 94°C for 1 min, an alignment step at 56°C for 1 min, an extension step at 72°C for 1 min and, when

2004); adicionalmente, se identificaron mediante técnicas moleculares en el Laboratorio de Fitopatología CIAD Unidad Culiacán y en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Campus Irapuato, Gto., México.

Para identificar los aislados bacterianos se tomó una colonia purificada con alrededor de 48-72 h de crecimiento. La extracción de ADN, se realizó de acuerdo con la metodología de Heddi *et al.* (1999); subsecuentemente se realizó la amplificación de gen 16S del ADNr mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores universales FD2 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y RP1 (5'-TACCTTGTTACGACTT-CACC-3'), los cuales amplifican un fragmento de 1500 pb; la amplificación se realizó en un termociclador T100™ Thermal Cycler (Singapore). Las condiciones de tiempo y temperatura incluyeron: un paso inicial de activación de la enzima a 95°C por 5 min, un segundo paso que comprendió 30 ciclos incluyendo una desnaturalización a 94°C por 1 min, un paso de alineamiento a 56°C por 1 min, un paso de extensión a 72°C por 1 min y cuando los ciclos se completaron, una extensión final a 72°C por 10 min (McLaughlin *et al.*, 2012).

Los fragmentos obtenidos de la PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en una cámara Powerpac™ Basic (BIO-RAD). Una vez detectado el fragmento esperado correspondiente a la región 16S, se purificó, se secuenció y se comparó su secuencia nucleotídica con secuencias disponibles en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990); por último, las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de genes del NCBI.

the cycles ended, a final extension step at 72°C for 10 min (McLaughlin *et al.*, 2012).

The PCR amplified fragments were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis in a Powerpac™ Basic chamber (BIO-RAD). Once detected, the expected fragment from the 16S region was purified and sequenced, and its nucleotidic sequence was compared to the sequences stored in the NCBI database (Altschul *et al.*, 1990). Finally, the obtained sequences were deposited in the NCBI gene bank.

### **Inhibiting germination of *P. capsici* zoospores using a suspension of *Bacillus* spp. cells**

The germination inhibition bioassay was conducted on concave slides. To induce *P. capsici* to produce sporangia, 5-mm agar disks with mycelium of the pathogen that had been growing for 5 days were taken and placed on Petri dishes to which 10 mL of distilled water were added, and incubated at 25-27°C for 48 h. To release the zoospores from the sporangia, the Petri dishes were incubated at 4°C for 30 min (Ko *et al.*, 2010) and a concentration of 20 zoospores/μL was obtained. Each slide concavity was filled with 20 μL of the zoospore suspension to which 20 μL of bacterial cell suspension of B17 and B32 isolates at a concentration of 1 x 10<sup>8</sup> colony forming units (CFU) 1:1 v/v were added, covered with a slide to prevent evaporation and incubated at 25-27°C for 24 h (Ko *et al.*, 2010). The zoospores that were not inoculated with the bacterial cell suspension were used as a control. To obtain the percentage of zoospore germination inhibition in the bioassays where cell suspension and bacterial filtrates were used, 100 zoospores



### **Inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* mediante el uso de suspensión celular de *Bacillus* spp.**

El bioensayo de inhibición germinativa se llevó a cabo en portaobjetos cóncavos. Para inducir la formación de esporangios de *P. capsici*, se tomaron discos de 5 mm de agar con micelio del patógeno con 5 días de crecimiento, éstos se colocaron en cajas Petri con 10 mL de agua destilada e incubada a 25-27°C por 48 h. Para la liberación de zoosporas del esporangio, las cajas Petri se incubaron a 4°C por 30 min (Ko *et al.*, 2010), logrando una concentración de 20 zoosporas/ $\mu$ L. Se colocaron 20  $\mu$ L de suspensión de zoosporas en cada concavidad del portaobjeto, se añadió 20  $\mu$ L de suspensión celular bacteriana de los aislados B17 y B32 a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC 1:1 v/v, se cubrió con un cubreobjetos para prevenir la evaporación, y se incubó por 24 h a 25-27°C (Ko *et al.*, 2010). Las zoosporas que no fueron inoculadas con la suspensión celular bacteriana se utilizaron como testigo. El porcentaje de inhibición germinativa de zoosporas, para los bioensayos con suspensión celular y filtrados bacterianos, se registró al contabilizar la germinación de 100 zoosporas en cada concavidad con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss AXIO Imager.A2), con cámara integrada (AxioCam ERc5s) con los objetivos 10x y 40x. Cada tratamiento contó con siete repeticiones y el experimento se realizó por duplicado.

### **Inhibición germinativa de zoosporas mediante el uso de filtrado bacteriano**

El filtrado bacteriano se obtuvo al colocar en un matraz Erlenmeyer, 50 mL de caldo nutritivo con 200  $\mu$ L de una suspensión de esporas de los aislados bacterianos B17 y B32 con una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC. Los matraces se incubaron a 30°C

from each concavity were counted using an optical microscope (Carl Zeiss AXIO Imager.A2) with an integrated camera (AxioCam ERc5s) and 10x and 40x objectives. Each treatment had seven replications and the experiment was conducted in duplicate.

### **Inhibition of zoospore germination using bacterial filtrates**

The bacterial filtrate was made by placing in an Erlenmeyer flask 50 mL of nutrient broth and 200  $\mu$ L of spore suspension of the B17 and B32 bacterial isolates at a concentration of  $1 \times 10^8$  UFC. The flasks were incubated at 30°C in an orbital shaker (140 rpm) for 6 days. The cultures were filtered using 0.22  $\mu$ m Millipore® filters to remove bacterial cells (Chen *et al.*, 2016b). To inhibit germination, 20  $\mu$ L of the zoospore suspension (20 zoospores/ $\mu$ L), mixed with 20  $\mu$ L of bacterial filtrate (1:1 v/v), were placed in the slide cavity, covered with a slide to prevent evaporation and then incubated at 25-27°C for 24 h (Ko *et al.*, 2010). Zoospores without bacterial filtrate were used as a control.

### **Antagonism of *Bacillus* spp. against *P. capsici* in vivo using cell suspension and bacterial filtrates in tomato and chili plants**

For the present study we used Malinche hybrid tomato seedlings and SV3198HJL hybrid chili seedlings 3 three weeks after germination. The *P. capsici* pathogen was inoculated directly into the root of both crops using 1 mL of the zoospore suspension ( $1 \times 10^3$ /mL) on both crops, followed by inoculation with 10 mL of the bacterial cell suspension ( $1 \times 10^8$ /mL) or their filtrates. All the treatments were applied under the same conditions.

The level of disease severity or damage was measured based on a scale for root neck rot

en un agitador orbital (140 rpm) por 6 días. Los cultivos se filtraron utilizando filtros Millipore® de 0.22 µm para eliminar las células bacterianas (Chen *et al.*, 2016b). Para la inhibición de la germinación, se colocaron 20 µL de suspensión de zoosporas (20 zoosporas/µL) en la cavidad del portaobjeto, mezclado con 20 µL del filtrado bacteriano (1:1 v/v), se cubrieron con cubreobjetos para prevenir la evaporación y se incubaron por 24 h a 25-27 °C (Ko *et al.*, 2010). Las zoosporas sin filtrado bacteriano se utilizaron como testigo.

### Antagonismo de *Bacillus* spp. sobre *P. capsici* *in vivo*, con el uso de suspensión celular y filtrados bacterianos en plantas de tomate y chile.

Las plántulas que se utilizaron para este estudio fueron, de tomate híbrido Malinche y de chile híbrido SV3198HJ con 3 semanas de desarrollo después de la germinación. La inoculación del patógeno *P. capsici* fue directa a la raíz, se colocó 1 mL de suspensión de zoosporas ( $1 \times 10^3$ /mL) para ambos cultivos, en seguida fueron inoculadas con 10 mL de suspensión de células bacterianas ( $1 \times 10^8$ /mL) o sus filtrados, las condiciones fueron las mismas para todos los tratamientos.

La severidad del daño o enfermedad se midió de acuerdo a una escala de síntomas de pudrición del cuello de raíz propuesta por Segarra *et al.* (2013) con la modificación de: 0 indica planta sin síntomas, 1 = síntomas de daños < 10 mm, 2 = 10 a 19 mm de pudrición, 3 = 20 a 30 mm de pudrición y 4 = > de 30 mm de pudrición. El porcentaje de la severidad del daño se calculó mediante la fórmula:  $\%SD = \sum \left[ \frac{GD \times NP}{EM \times TP} \right] \times 100$  donde:

symptoms that was proposed by Segarra *et al.* (2013) and modified as follows: 0 = symptomless plants, 1 = damage symptoms < 10 mm, 2 = 10-19 mm rotted, 3 = 20-30 mm rotted, and 4 = > 30 mm rotted. The percentage of damage severity was calculated using the following formula:  $\%SD = \sum \left[ \frac{GD \times NP}{EM \times TP} \right] \times 100$  where % DS= percentage of damage severity; GD= level of damage; NP= number of damaged plants; EM= maximum level of damage on the severity scale; and TP= number of plants included in the treatment (Shanmugam and Kanoujia, 2011; Li *et al.*, 2012). The control effectiveness was calculated using the following formula:  $\%EC = \frac{100 - SD \text{ del tratamiento}}{SD \text{ del control}} \times 100$  where % EC = percentage of the control effectiveness; treatment SD = average damage severity per treatment; control SD = average damage severity on the control (Li *et al.*, 2012). The experiment included three replications per treatment and was conducted in duplicate in the glasshouse. We used a pot with three seedlings as the experiment unit. This study was conducted on two different dates, and the analyzed data were reported as evaluation averages.

### Statistical analyses

A completely randomized design was used in both bioassays, *in vitro* and *in vivo* and the data obtained were analyzed using a variance analysis (ANOVA) and the Minitab 17 statistical program. We used Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ) to compare the means.

%SD= porcentaje de severidad de daño, GD= grado de daño, NP= número de plantas dañadas, EM= grado de daño máximo de la escala de severidad y TP= número de plantas del tratamiento (Shanmugam y Kanoujia, 2011; Li *et al.*, 2012) y la eficacia de control se calculó utilizando la fórmula: 
$$\%EC = \frac{100 - SD \text{ del tratamiento}}{SD \text{ del control}} \times 100$$
 donde % EC = porcentaje de eficacia de control, SD del tratamiento = media de severidad de daño por tratamiento, SD del control = media de severidad de daño del control (Li *et al.*, 2012); el experimento consistió en tres repeticiones por tratamiento bajo invernadero por duplicado. La unidad experimental fue una maceta con tres plántulas. Este estudio se realizó en dos fechas diferentes, los datos analizados se reportaron como promedios de las evaluaciones.

### Análisis estadísticos

Para ambos bioensayos *in vitro* e *in vivo* se utilizó un diseño completamente al azar, y los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con en el programa estadístico Minitab 17; así mismo, la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Identificación morfológica

Las colonias bacterianas de B17 y B32, mostraron características similares en cuanto a su forma y color. Las colonias del aislado B17 presentan una elevación en el centro (acuminada) con una consistencia cremosa y mucoide a diferencia del aislado B32, las cuales se observan planas y de consistencia seca y grumosa.

## RESULTS

### Morphological identification

The bacterial colonies of B17 and B32 were similar in shape and color. The colonies of the B17 isolate showed a mound of creamy and mucoid consistency (acuminate) in the middle compared to those of the B32 isolate, which were flat and of dry and lumpy consistency.

Both isolates were Gram positive and developed peritrichous flagella. Cells of the B17 isolate were between 2.0 and 3.2  $\mu\text{m}$  long., while the cells of the B32 isolate were between 3.0 and 4.5  $\mu\text{m}$  long. The latter also developed parasporal crystals (Cry protein), which are similar to the most important features of the bacteria of the *Bacillus* genus, which are bacillar in shape, 0.5-2.5 and 1.2-10  $\mu\text{m}$  in cell size, Gram positive to stain and move through flagella inserted peritrichously.

### Molecular identification

The PCR sequences of the B17 and B32 isolates were 99% to 100% identical to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus thuringiensis*, respectively, when compared to the sequences already reported in the Gen Bank database (NCBI). The sequences were included in the database with Access number KX953161.1 for B17 and KX953162.1 for B32.

### Inhibition of *P. capsici* zoospore germination using a *Bacillus* spp. cell suspension

The results show that both bacteria inhibit zoospore germination and deform the germinative tube after 24 h (Figures 1 and 2). In the control



Ambos aislados resultaron Gram positivos y flagelos peritricos. Las medidas celulares del aislado B17 oscilaron entre 2.0 a 3.2  $\mu\text{m}$  de longitud; a su vez, el tamaño celular del aislado B32 fue de 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$ ; además, en este aislado se observó la presencia de cristales parasporales (proteína Cry), coincidiendo con las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales son de forma bacilar, movilidad por flagelos insertados en forma peritrica, tamaño celular de 0.5-2.5 y 1.2-10  $\mu\text{m}$  y tinción Gram positivas.

### Identificación molecular

Las secuencias obtenidas mediante la técnica molecular de PCR de los aislados B17 y B32, mostraron una identidad del 99 al 100% con *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus thuringiensis* respectivamente al ser comparadas con secuencias ya reportadas en la base de datos del Gen Bank (NCBI); las secuencias fueron depositadas en la base de datos donde se les asignó el No. de acceso KX953161.1 para la cepa B17 y KX953162.1 para B32.

### Inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* mediante el uso de suspensión celular de *Bacillus* spp.

Los resultados muestran que ambas bacterias inhiben la germinación de zoosporas; así como, deformación en el tubo germinativo después de 24 h (Figuras 1 y 2). En los tratamientos testigo, las zoosporas a las 24 h después de ser liberadas del esporangio presentaron un 100% de germinación. La cepa de *B. amyloliquefaciens* causó 88.15% de inhibición germinativa; mientras que, la cepa *B. thuringiensis* fue más efectiva al causar un 97.05% de inhibición (Cuadro 1).

treatments, 24 h after being released from the sporangium, zoospores showed 100% germination. The *B. amyloliquefaciens* isolate caused 88.15% germinative inhibition, but the *B. thuringiensis* isolate was more effective and caused 97.05% inhibition (Table 1).

### Inhibition of *P. capsici* zoospore germination using *Bacillus* spp. filtrates

*Bacillus amyloliquefaciens* bacterial filtrates inhibited 24.3% of *P. capsici* zoospore germination *in vitro*, while *B. thuringiensis* filtrates produced 49.35% inhibition. The control showed 100% germination (Table 1).

### Severity of damage caused by *P. capsici* using cell suspension and bacterial filtrates in tomato and chili plants.

The results indicate that in plants treated with a *B. thuringiensis* cell suspension, the disease incidence was 38.89% in chili and 22.22% in tomato plants, while in plants treated with a *B. amyloliquefaciens* cell suspension, the incidence was 61.11% in chili and 27.78% in tomato. When the plants were inoculated with filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, the level of severity of neck rot symptoms was greater than 90% and 70% in chili plants and 60% and 40% in tomato plants, respectively (Table 2).

### Biological effectiveness of *Bacillus* spp. on *P. capsici* using cell suspension and bacterial filtrates in tomato and chili plants.

The obtained results show that in chili and tomato plants inoculated with a cell suspension of

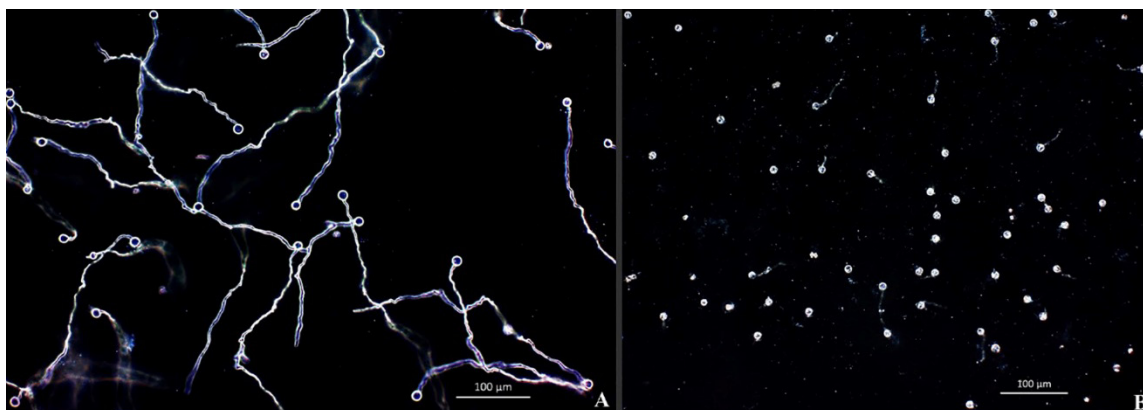


Figura 1. Efecto de la suspensión celular o filtrado de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* en la inhibición germinativa de zoosporas de (*P. capsici*) 24 h post-inoculación. (A) germinación de zoosporas sin tratamiento utilizado como control. (B) inhibición germinativa con tratamiento. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio con objetivo (10x) en campo oscuro.

Figure 1. Effect of the cell suspension and filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* on *P. capsici* zoospores germination inhibition 24 h after inoculation. (A) zoospores germination without the treatment used as a control. (B) germination inhibition with the treatment. The photographs were taken under a darkfield microscope with objective (10x).

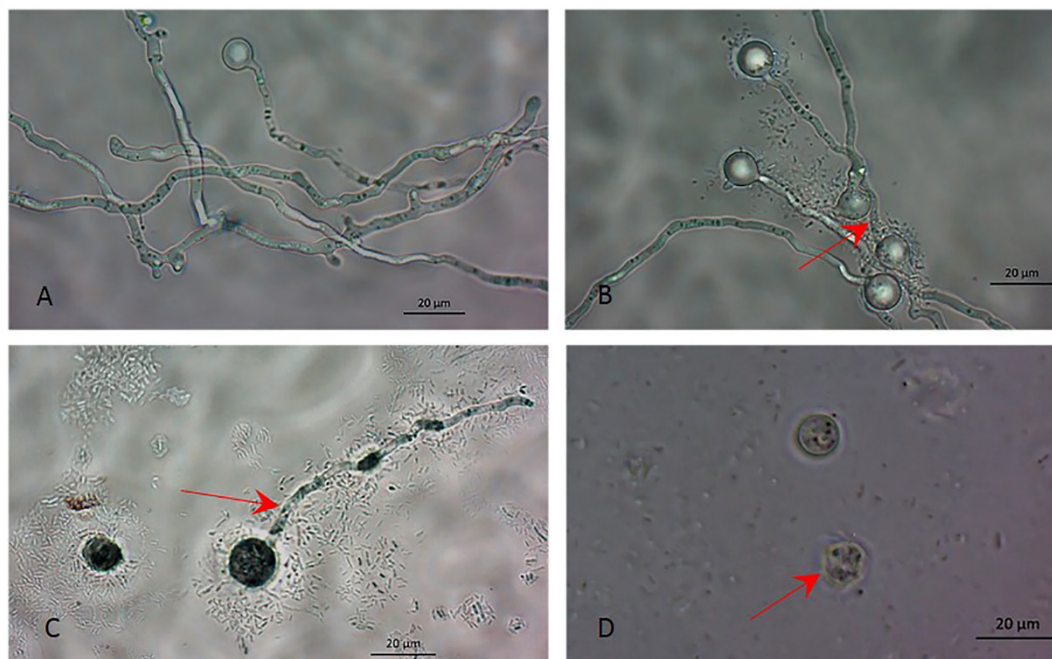


Figura 2. La morfología de la zoospora de *P. capsici* germinada con y sin tratamiento bacteriano (suspensión celular o filtrados) de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. (A) Zoospora germinada sin inoculación. (B y C) tubo germinativo anormal y zoosporas sin germinación y (D) las paredes de la zoospora de *P. capsici* se lisaron cuando fueron tratadas con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. Las fotografías fueron tomadas bajo microscopio con objetivo (40x) en campo claro.

Figure 2. Morphology of a *P. capsici* germinated zoospore with and without *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* bacterial treatment (cell suspension or filtrates). (A) Germinated zoospore without inoculation. (B y C) Unusual germinative tube and non-germinated zoospores, and (D) *P. capsici* zoospore cells became bare when treated with *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension. The photographs were taken under a bright-field microscope with objective (40x).

### Inhibición germinativa de zoosporas de *P. capsici* mediante el uso de filtrado de *Bacillus* spp.

Los filtrados bacterianos de *B. amyloliquefaciens* inhibieron la germinación de zoosporas de *P. capsici* a nivel *in vitro* 24.3%; mientras que con los filtrados de *B. thuringiensis* se obtuvo 49.35% de inhibición. En el testigo se observó el 100% de germinación (Cuadro 1).

### Severidad de daño causada por *P. capsici* con el uso de suspensión celular y filtrados bacterianos en plantas de tomate y chile.

Los resultados indican que las plantas tratadas con suspensión celular de *B. thuringiensis*, presentan una incidencia de la enfermedad en ambos cultivos de 38.89% en plantas de chile y 22.22% en tomate; mientras que, las plantas tratadas con suspensión celular de *B. amyloliquefaciens*, se observa 61.11% de incidencia de la enfermedad en plantas de chile y 27.78% en tomate. Cuando las plantas fueron inoculadas con filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, la severidad de los síntomas de la pudrición del cuello fue mayor 90 y 70% en plantas de chile y 60 y 40% en plantas de tomate respectivamente (Cuadro 2).

### Eficacia biológica de *Bacillus* spp. sobre *P. capsici*, con el uso de suspensión celular y filtrados bacterianos en plantas de tomate y chile.

En los resultado obtenidos se observa que en las plantas que fueron inoculadas con suspensión celular de *B. thuringiensis*, se obtuvo una eficacia de biocontrol mayor al 60 y 77% en plantas de chile y tomate respectivamente; mientras que, en las plantas de chile y tomate tratadas con filtrados bacterianos se observó una eficacia menor al 28 y 56% respectivamente (Cuadro 3). La suspensión celular

**Cuadro 1. Inhibición de germinación de las zoosporas (*P. capsici*) mediante el uso de suspensión celular y filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, 24 h después de la inoculación.**

**Table 1. Inhibition of (*P. capsici*) zoospores germination using *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension and filtrates 24 h after inoculation.**

Tratamientos	% de inhibición de la germinación <sup>x</sup> + DE	
	Suspensión Cel.	Filtrados
Control (Agua)	0.00 a <sup>y</sup>	0.00 a
<i>B. amyloliquefaciens</i>	88.15±2.519 b	24.30±6.280 b
<i>B. thuringiensis</i>	97.05±1.191 c	49.35±5.031 c

<sup>x</sup>Las medias con letras distintas son significativamente diferentes (ANDEVA), de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Means with different letters are significantly different (ANOVA), according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup>Inhibición germinativa = (Número de zoosporas germinadas/Total de zoosporas) x 100 (Chen *et al.*, 2016b). DE = Desviación estándar / <sup>z</sup>Germination inhibition = (Number of germinated zoospores/Total of zoospores) x 100 (Chen *et al.*, 2016b). SD= Standard deviation.

*B. thuringiensis*, the efficacy of the biocontrol was higher than 60 and 77%, respectively, while in the plants treated with bacterial filtrates, the efficacy was lower than 28 and 56%, respectively (Table 3). The biocontrol efficacy of the cell suspension of *B. amyloliquefaciens* in chili was only 38.89%, while in tomato it was significantly higher, more than 72%. However, the biocontrol efficacy of its bacterial filtrates was lower than 6 and 38% in chili and tomato plants, respectively (Table 3, Figure 3).

## DISCUSSION

The disease caused by *P. capsici* is very important because it affects economically important crops such as tomato and chili (Agrios, 2005; Hansen *et al.*, 2012). Considering this situation, and because chemical control and most crop management practices are not efficient tools to

**Cuadro 3. Eficacia biológica de la suspensión celular y filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* sobre *P. capsici* en plántulas de chile y tomate.**

**Table 3. Biological effectiveness of the suspension and filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* on *P. capsici* in chili and tomato seedlings.**

Tratamiento	Eficacia biológica (%) <sup>x</sup> +DE	
	Chile	Tomate
<i>P. capsici</i>	0 c <sup>y</sup>	0 d
S. Cel. <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>P. capsici</i>	38.89±3.61 b	72.25±2.20 a
S. Cel. <i>B. thuringiensis</i> - <i>P. capsici</i>	61.11±5.03 a	77.78±0.00 a
Filtrado <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>P. capsici</i>	5.56±7.78 c	38.89±3.61 c
Filtrado <i>B. thuringiensis</i> - <i>P. capsici</i>	27.78±3.38 b	55.56±0.00 b

<sup>x</sup>Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (ANDEVA), de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Means that do not share a letter are significantly different (ANOVA), according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup>Eficacia de control = (100 - media de severidad de daño por tratamiento)/(media de severidad de daño del control) x 100 (Li *et al.*, 2012). DE = Desviación estándar / <sup>y</sup>Effectiveness of the control = (100 - average severity of damage per treatment)/(average severity of damage from the control) x 100 (Li *et al.*, 2012). SD= Standard deviation.

de *B. amyloliquefaciens* mostró una eficacia de biocontrol en plantas de chile tan solo de 38.89%; mientras que, en tomate fue significativa con más del 72%; sin embargo, la eficacia de biocontrol de

reduce the damage caused by *P. capsici* in tomato and chili seedlings, the use of biocontrol organisms could be a promising alternative (Bae *et al.*, 2016; Thampi and Bhai, 2017).

**Cuadro 2. Severidad de daño por *P. capsici* en plántulas de chile y tomate tratadas con suspensión celular y filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* después de 7 d de inoculación.**

**Table 2. Table 2. Severity of damage caused by *P. capsici* in chili and tomato seedlings treated with *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension and filtrates 7 d after inoculation.**

Tratamiento	Severidad de daño (%) <sup>x</sup> +DE			
	Chile		Tomate	
	S. celular	Filtrado	S. celular	Filtrado
Control (Agua)	0.00 c <sup>y</sup>	0.00 c	0.00 c	0.00 c
<i>P. capsici</i>	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>P. capsici</i>	61.11±6.49 b	94.44±2.26 ab	27.78±4.18 b	61.11±4.18 b
<i>B. thuringiensis</i> - <i>P. capsici</i>	38.89±4.18 b	72.25±4.18 b	22.22±2.87 bc	44.44±4.54 b

<sup>x</sup>Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (ANDEVA), de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) / <sup>y</sup>Means that do not share a letter are significantly different (ANOVA), according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>y</sup>Severidad de daño =  $[\Sigma (\text{grado de daño} \times \text{número de plantas dañadas}) / (\text{grado de daño máximo de la escala de severidad} \times \text{total de plantas del tratamiento})] \times 100$ . DE = Desviación estándar / <sup>y</sup>Severity of damage =  $[\Sigma (\text{extent of damage} \times \text{number of damaged plants}) / (\text{extent of maximum damage in the severity scale} \times \text{total of plants from the treatment})] \times 100$ . SD= Standard deviation.



sus filtrados bacterianos estuvo por debajo de 6 y 38% en plantas de chile y tomate respectivamente (Cuadro 3, Figura 3).

## DISCUSIÓN

La enfermedad producida por *P. capsici* es muy importante debido a que afecta a cultivos de importancia económica como tomate y chile (Agrios 2005; Hansen *et al.*, 2012). Tomando en cuenta esta situación, y a que el control químico y la mayoría de las prácticas culturales no representan herramientas efectivas para disminuir la incidencia de daño por este patógeno en plántulas de tomate y chile, el uso de organismos de biocontrol pueden ser una alternativa promisoriosa (Bae *et al.*, 2016; Thampi y Bhai, 2017).

Since the microorganisms of the *Bacillus* genus are found mainly in the soil, in this study we used two bacterial isolates whose morphological traits belong to that genus. Using molecular techniques, the B17 isolate was identified as *B. amyloliquefaciens*, and isolate B32 was in alignment with *B. thuringiensis* and *B. cereus*. However, different authors, such as Sánchez *et al.* (2016), mention that one of the main differences between *B. thuringiensis* and *B. cereus* is that they produce parasporal crystals (Cry protein), a characteristic of *B. thuringiensis* observed in the B32 isolate.

It was also demonstrated that they show the effect of biocontrol and *P. capsici* zoospore germination inhibition in tomato and chili seedlings, because *P. capsici* zoospore germination inhibition *in vitro* was  $88.15 \pm 2.5$  and  $97.05 \pm 1.19\%$  when we used cell suspensions of *B. amyloliquefaciens*



**Figura 3.** Eficacia de control de la enfermedad ocasionada por *P. capsici* en plántulas de chile y tomate mediante el uso de suspensión celular o filtrados de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*. Las plántulas fueron inoculadas con 1  $\mu\text{L}$  de zoosporas  $1 \times 10^3$  y 10  $\mu\text{L}$  de suspensión celular o filtrado. (A) daño por *P. capsici* en plántulas de chile, (B) plántulas de chile con *P. capsici*+suspensión celular de *B. thuringiensis*, (C) daño por *P. capsici* en tomate y (D) plántulas de tomate con *P. capsici*+suspensión celular de *B. thuringiensis*.

**Figure 3.** Effectiveness to control the disease caused by *P. capsici* in chili and tomato seedlings using *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* cell suspension or filtrate. The seedlings were inoculated with 1  $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^3$  zoospores and 10  $\mu\text{L}$  of cell suspension or filtrate. (A) damage caused by *P. capsici* in chili seedlings, (B) chili seedlings with *P. capsici*+cell suspension of *B. thuringiensis*, (C) damage caused by *P. capsici* in tomato, and (D) tomato seedlings using *P. capsici*+cell suspension of *B. thuringiensis*.



Los microorganismos del género *Bacillus* se encuentra principalmente en suelo, en este estudio se trabajó con dos aislados bacterianos, cuyas características morfológicas pertenecen al género *Bacillus*. Estos fueron identificados mediante técnicas moleculares el aislado B17 como *B. amyloliquefaciens* y B32 mostró un alineamiento con *B. thuringiensis* y *B. cereus*; sin embargo, de acuerdo a diversos autores tal como Sánchez *et al.*, 2016, mencionan que una de las principales diferencias entre *B. thuringiensis* y *B. cereus*, es la producción del cristal parasporal (proteína cry), característico de *B. thuringiensis*; en la que se observó en nuestro aislado B32.

Así mismo, se demostró que presentan efecto de biocontrol e inhibición de la germinación de zoosporas de *P. capsici* en plántulas de tomate y chile al observar que la inhibición de la germinación de zoosporas de *P. capsici* a nivel *in vitro* fue del  $88.15 \pm 2.5$  y  $97.05 \pm 1.19\%$  al utilizar suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, respectivamente. Torres *et al.* (2016) reportaron una inhibición del  $56.5 \pm 2.1\%$  sobre el crecimiento micelial de *Macrophomina phaseolina* mediante la técnica de cultivo dual, utilizando suspensión celular de *B. amyloliquefaciens*. De acuerdo con lo observado en el trabajo de Torres *et al.* (2016) y en el presente trabajo, se demuestra que la capacidad biocontroladora de *B. amyloliquefaciens* se ve afectada por la naturaleza del patógeno, ya que al confrontar la suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* con zoosporas de *P. capsici* en medio de cultivo líquido, se observa una inhibición germinativa del 88.15%. Por otro lado, Chen *et al.* (2016b), reportaron una tasa de germinación de zoosporas de *P. capsici* del 100% al ser confrontadas con filtrados obtenidos de un cultivo de *Streptomyces plicatus*, donde los ingredientes del medio de cultivo fueron papa y sucrosa; sin embargo, los resultados que obtuvieron al utilizar filtrados provenientes de medios de cultivo

and *B. thuringiensis*, respectively. Torres *et al.* (2016) reported  $56.5 \pm 2.1\%$  inhibition of *Macrophomina phaseolina* mycelial growth using the dual crop technique and cell suspension of *B. amyloliquefaciens*. According to Torres *et al.* (2016) and to the present study, it has been proven that *B. amyloliquefaciens* biocontrol capacity is affected by the pathogen's nature, because when the cell suspension of *B. amyloliquefaciens* was mixed with *P. capsici* zoospores in a liquid culture medium, it caused 88.15% germination inhibition. On the other hand, Chen *et al.* (2016b) reported 100% *P. capsici* zoospore germination when they were mixed with filtrates from a *Streptomyces plicatus* culture whose ingredients were potato and sucrose. However, the results obtained using filtrates from a culture medium containing chitin, potato and sucrose show 100% zoospore germination, a fact that indicates that biocontrol agents are more effective when the pathogen to be controlled is present than under conditions that do not threaten its development. This was demonstrated by using bacterial filtrates of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* on a suspension of *P. capsici* zoospores, where  $24.30 \pm 6.28$  and  $49.35 \pm 5.03\%$  germination inhibition was observed, respectively, which is lower than that observed when a cell suspension was used.

While conducting *in vivo* experiments using cell suspensions of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis*, damage severity was  $61.11 \pm 6.49$  and  $38.89 \pm 4.18\%$ , respectively, while the control showed 100% damage. Several *Bacillus* species are promising as part of the biocontrol strategy given their ability to produce a variety of antibacterial and antifungal metabolites (Zhi *et al.*, 2017). Due to their versatile ability to produce bioactive compounds, different *Bacillus* species are being studied in order to use them in several applications (Torres *et al.*, 2017). For example, many *Bacillus* isolates produce

que contenían quitina, papa y sucrosa, alcanzaron una inhibición de la germinación de zoosporas del 100%, lo que demuestra que los agentes de biocontrol son más eficientes en presencia del patógeno a controlar, que si se encuentran en condiciones que no amenacen su desarrollo. Esto se demostró al utilizar filtrados bacterianos de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis*, sobre una suspensión de zoosporas de *P. capsici*, donde se observó una inhibición de la germinación de  $24.30 \pm 6.28$  y  $49.35 \pm 5.03\%$  respectivamente, mucho menor a la que se observó al utilizar la suspensión celular.

Durante los experimentos *in vivo*, se observó una severidad de daño del  $61.11 \pm 6.49$  y  $38.89 \pm 4.18\%$  al utilizar suspensión celular de *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* respectivamente, mientras que el control presentó el 100% de daño. Algunas especies de *Bacillus* son promisorias dentro del biocontrol, debido a su capacidad de producir una variedad de metabolitos antibacterianos y antifúngicos (Zhi *et al.*, 2017). Debido a su versatilidad como productores de compuestos bioactivos, se están estudiando diferentes especies de *Bacillus* para varias aplicaciones potenciales (Torres *et al.*, 2017). Por ejemplo, muchas cepas de *Bacillus* producen una variedad de lipopéptidos cíclicos antifúngicos (CLP), incluyendo miembros de las familias surfactina, iturina y fengicina (Torres *et al.*, 2016). Se ha demostrado que los lipopéptidos pertenecientes a las familias iturina, fengicina y surfactina son los compuestos más importantes en la actividad de biocontrol de cepas de *Bacillus* contra diferentes hongos fitopatógenos de diferentes especies de plantas (Masmoudi *et al.*, 2017; Abdallah *et al.*, 2017). Por lo tanto, el control de las enfermedades fúngicas por los *Bacillus*, representaría una oportunidad relevante para la biotecnología agrícola.

Varios autores han reportado a *B. amyloliquefaciens* como una alternativa de biocontrol para diferentes patógenos (Yu y Lee., 2013; Wei *et al.*, 2015;

several antifungal cyclic lipopeptides (CLPs), including members of the surfactin, iturine and fengycin families (Torres *et al.*, 2016). It has been demonstrated that lipopeptides belonging to the iturine, fengycin and surfactin families, are the most important compounds in the biocontrol activity of *Bacillus* isolates against different phytopathogenic fungi in different plant species (Masmoudi *et al.*, 2017; Abdallah *et al.*, 2017). Therefore, using *Bacillus* to control fungal diseases would be a great opportunity for agricultural biotechnology.

Several authors have reported *B. amyloliquefaciens* as a biocontrol option for different pathogens (Yu and Lee., 2013; Wei *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016b; Abdallah *et al.*, 2017). However, there are no reports on *P. capsici* control of tomato and chili in which *B. amyloliquefaciens* shows effective biocontrol; therefore, based on the results obtained in the present study, more research on this microorganism must be conducted. *Bacillus thuringiensis* has also proven to be efficient mainly for controlling insects in different crops and fruits after harvest (Zheng *et al.*, 2013; Deepak and Jayapradha 2015; Kim *et al.*, 2017). Mojica-Marín *et al.* (2009) reported they controlled chili wilting using *B. thuringiensis*, but their study was directly conducted on germination of seeds inoculated with *P. capsici*, where 62 to 93% germination was observed on treated seeds. However, information on the use of *B. thuringiensis* for controlling *P. capsici* in tomato and chili seedlings is almost nil.

## CONCLUSIONS

The cell suspensions of *B. amyloliquefaciens* and *B. thuringiensis* species produced significantly higher inhibition than their filtrates on *P. capsici* zoospores. They also showed biological control

Zhang *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016b; Abdallah *et al.*, 2017); sin embargo, para el biocontrol de *P. capsici* en cultivos de tomate y chile no existen reportes donde *B. amyloliquefaciens* presente un biocontrol efectivo, por lo que, de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, es necesario más investigación con este microorganismo. Así mismo, *B. thuringiensis* ha demostrado ser eficiente principalmente en el control de insectos, en distintos cultivos y frutos poscosecha (Zheng *et al.*, 2013; Deepak y Jayapradha 2015; Kim *et al.*, 2017). Mojica-Marín *et al.* (2009) reportaron el biocontrol de la marchitez del chile mediante el uso de *B. thuringiensis*, solo que el trabajo se realizó directamente en la germinación de semillas inoculadas con *P. capsici*, donde se observó una germinación entre 62 y 93% de las semillas tratadas; sin embargo, la información es casi nula con respecto al uso de *B. thuringiensis* en el biocontrol de *P. capsici* en plántulas de tomate y chile.

## CONCLUSIONES

La suspensión celular de las especies *B. amyloliquefaciens* y *B. thuringiensis* causaron una inhibición significativamente mayor que sus filtrados sobre las zoosporas de *P. capsici*. Así mismo, presentaron potencial de control biológico en cultivos de tomate y chile contra *P. capsici*. Lo que sugiere la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica. Por lo que estos microorganismos pueden ser usados como agentes de biocontrol de *P. capsici* en plantas de tomate y chile. Por lo tanto, se requieren de más estudios en la identificación de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos, producidos por estas bacterias y evaluar su capacidad antifúngica.

potential in tomato and chili crops against *P. capsici*. This result suggests that these microorganisms produce secondary metabolites that have biological activity and can thus be used as *P. capsici* biocontrol agents in tomato and chili plants. Therefore, more studies are required to identify secondary metabolites or bioactive compounds produced by these bacteria, as well as to assess their antifungal capacity.

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

## LITERATURA CITADA

- Abdallah RAB, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H, Papadopoulou KK and Daami-Remadi M. 2017. Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection* 99:45-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.008>
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier. Academic Press. USA. Pp. 305-592.
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-40. Disponible línea: <https://www.biostat.wisc.edu/bmi576/papers/blast.pdf>
- Bae SJ, Mohanta TK, Chung JY, Ryu M, Park G, Shim S, Hong SB, Seo H, Bae DW, Bae I, Kim JJ and Bae H. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. *Biological Control* 92:128-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.10.005>
- Castillo C, Sosa B y Scorza J. 2004. Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [online]. Vol.24, n.1-2 [citado 2017-09-14], pp. 65-67. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562004000100011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100011&lng=es&tlng=es)
- Chen JT, Su HJ and Huang JW. 2012. Isolation and identification of secondary metabolites of *Clitocybe nuda* responsible for inhibition of zoospore germination of *Phytophthora capsici*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:7341-7344. <http://dx.doi.org/10.1021/jf301570y>
- Chen X, Zhang Y, Fu X, Li Y and Wang Q. 2016 a. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest Biology and Technology* 115:113-121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>

- Chen YY, Chen PCh and Tsay TT. 2016 b. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biological Control* 98:34-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
- Deepak R and Jayapradha R. 2015. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak 2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. *Journal de Mycologie Médicale* 25:15-24. <https://doi.org/10.1016/j.myc-med.2014.10.011>
- Erwin D and Ribeiro O. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. The American Phytopathological Society. 562 p.
- González ChMM, Villordo PE, Pons HJL, Delgadillo SF, Paredes MR, Godoy HH, Anaya LJJ, Gámez VFP, Medina CT, Rodríguez GR, Ruiz CE, Ruiz LA, Cárdenas BR, Cárdenas AJR, Torres PI, Rendón PE, Martínez SJ, Mojarro DF, Villaseñor EOM y Guerrero ABZ. 2009. Guía para el manejo de la marchitez del chile en Guanajuato. Primera Edición. Prometeo Editores, S. A. de C. V. CEPROCH-Guanajuato. México, D. F. 34 pp.
- Gómez RO, Corona TT and Aguilar RVH. 2017. Differential response of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines to *Phytophthora capsici* and root-knot nematodes. *Crop Protection* 92:148-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.023>
- Hansen EM, Reeser PW and Sutton W. 2012. *Phytophthora* beyond agriculture. *Annual Review of Phytopathology* 50:359-378. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172946>
- Hausbeck MK and Lamour KH. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88:1292-1303. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1292>
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H and Nardon P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and Wolbachia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6814-6819. Disponible en línea: <http://www.pnas.org/content/96/12/6814.full>
- Kang SW and Kim SW. 2004. New antifungal activity of *Penicillium* acid against *Phytophthora* species. *Biotechnology Letters* 26:695-698. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000024090.96693.a4>
- Khan MA, Cheng Z, Xiao X, Khan AR and Ahmed SS. 2011. Ultrastructural studies of the inhibition effect against *Phytophthora capsici* of root exudates collected from two garlic cultivars along with their qualitative analysis. *Crop Protection* 30:1149-1155. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.013>
- Kim HS, Noh S and Park Y. 2017. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ac and Cry1 Ca toxicity against *Spo-doptera exigua* (Hubner) by suppression of a chitin synthase B gene in midgut. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20:199-205. DOI: 10.1016/j.aspen. 2016.12.015
- Ko WH, Tsou YJ, Lin MJ and Chern LL. 2010. Activity and characterization of secondary metabolites produced by a new microorganism for control of plant diseases. *New Biotechnology* 27:397-402. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.05.014
- Lamour KH, Stam R, Jupe J and Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* 13:329-337. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Li CH, Shi L, Han Q, Hu HL, Zhao MW, Tang CM and Li SP. 2012. Biocontrol of *verticillium* wilt and colonization of cotton plants by an endophytic bacterial isolate. *Journal of Applied Microbiology* 113:641-651. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05371.x
- Masmoudi F, Khedher SB, Kamoun A, Zouari N, Tounsi S and Trigui M. 2017. Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amylo-liquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*. 197:29-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.001>
- McLaughlin RW, Chen M, Zheng J and Wang D. 2012. Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*. *Molecular Biology Reports* 39(5):5669-5676. DOI: 10.1007/s11033-011-1375-0
- Mojica-Marín V, Luna-Olvera HA, Sandoval-Coronado CF, Pereyra-Aferez B, Mrales-Ramos LH, Gonzalez-Aguilar NA, Hernandez-Luna CE y Alvarado-Gomez OG. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 78:105-110. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v78n2/v78n2a04.pdf>
- Naing KW, Anees M, Nguyen XH, Lee YS, Jeon SW, Kim SJ, Kim MH and Kim KY. 2014. Biocontrol of late blight disease (*Phytophthora capsici*) of pepper and the plant growth promotion by *Paenibacillus ehimensis* KWN38. *Journal of Phytopathology* 162:367-376. DOI: 10.1111/jph.12198
- Nguyen XH, Naing KW, Lee YS, Tindwa H, Lee GH, Jeong BK, Ro HM, Kim SJ, Jung WJ and Kim KY. 2012. Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. *The Plant Pathology Journal* 28(3):282-289. DOI: 10.5423/PPJ.OA.03.2012.0040
- Pal KK and Gardener BM. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Qi R, Wang T, Zhao W, Li P, Ding J and Gao Z. 2012. Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to Metalaxyl. *Journal Phytopathology* 160:717-722. DOI:10.1111/jph.12009
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E and 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>
- Sánchez J, Correa M y Castañeda-Sandoval LM. 2016. *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública* 34(2):230-242. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12



- Sanogo S and Ji P. 2013. Water management in relation to control of *Phytophthora capsici* in vegetable crops. *Agricultural Water Management* 129:113-119. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.07.018>
- Segarra G, Aviles M, Casanova E, Borrero A and Trillas I. 2013. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T34. *Phytopathology Mediterraneana* 52(1):77-83. <http://hdl.handle.net/11441/30458>
- Shanmugam V and Kanoujia N. 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control* 57:85-93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.001>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Cierre de la producción agrícola por estado. [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx).
- Thampi A and Bhai RS. 2017. Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control* 109:1-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.006>
- Torres MJ, Brandan CP, Sabaté DC, Petroselli G, Erra-Balsells R and Audisio MC. 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBac-CA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*. 105:93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.12.001>
- Torres MJ, Perez Brandan CP, Petroselli G, Erra-Balsells R and Audisio MC. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiological Research* 182:31-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>
- Wang CK, Liang CY, Chu CH and Lin MJ. 2011. Genetic comparison of sexual and asexual reproduction of *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology Bulletin* 20:98-107. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123409244>
- Wei Z, Huang J, Yang Ch, Xu Y, Shen Q and Chen W. 2015. Screening of suitable carriers for *Bacillus amyloliquefaciens* strain QL-18 to enhance the biocontrol of tomato bacterial wilt. *Crop Protection* 75:96-103. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.05.010>
- Yang R, Fan X, Cai X and Hu F. 2015. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacteria strains isolated from *Ginkgo biloba* against pepper *phytophthora* blight. *Biological Control* 85:59-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.013>
- Yu SM and Lee YH. 2013. Effect of light quality on *Bacillus amyloliquefaciens* JBC36 and its biocontrol efficacy. *Biological Control* 64:203-210. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.004>
- Zhang JX, Gu YB, Chi FM, Ji ZR, Wu JY, Dong QL and Zhou ZS. 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* GB1 can effectively control apple valsa canker. *Biological Control* 88:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.022>
- Zhang S, White TL, Martinez MC, McInroy JA, Kloepper JW and Klassen W. 2010. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control* 53:129-135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.015>
- Zhao P, Quan C, Wang Y, Wang J and Fan S. 2013. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of Basic Microbiology* 54:448-456. DOI: 10.1002/jobm.201200414
- Zheng M, Shi J, Shi J, Wang Q and Li Y. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control* 65:200-206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>
- Zhi Y, Wu Q and Xu Y. 2017. Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource Technology* 235:96-103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>