



**UNIVERSIDAD  
MICHUACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y  
FORESTALES**

**Bacteriófagos y micorrización en plantas de Chile  
"Chilaca" para el control biológico de la mancha  
bacteriana causada por *Xanthomonas vesicatoria***

**TESIS**

**Que presenta**

**Ing. Susana Bautista Villegas**

**Como requisito para obtener el grado de Maestro en  
Producción agropecuaria**

**Director de Tesis**

**Dr. Luis López Pérez (IIAF-UMSNH)**

**Co-Director de Tesis**

**Dr. Gabriel Rincón Enríquez (CIATEJ)**

**Morelia, Michoacán, Julio del 2019**



El trabajo de esta tesis de investigación de maestría formó parte de los proyectos intitulados:

**“Nanobiocontrol inteligente de bacterias fitopatógenas (*Xanthomonas*) de solanáceas de importancia agrícola en México”**

**Líder del proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez (CIATEJ).**

**Financiado por la Convocatoria de Problemas Nacionales, clave CONACyT: 2015-01-338 (Convocatoria 2015)**

Igualmente, este trabajo contó con apoyo del proyecto 293362 (CONACyT) del laboratorio nacional PLANTECC.

**Líderes del proyecto: Dr. Gabriel Rincón Enríquez (CIATEJ) y Dr. Axel Tiessen Favier (CINVESTAV-IPN).**

La presente investigación de maestría se desarrolló en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás De Hidalgo y el Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A. C. bajo la dirección del Dr. Luis López Pérez y la co-dirección del Dr. Gabriel Rincón Enríquez así como la asesoría de la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, la Dra. Cecilia Guízar González, el Dr. Jhony Navat Enríquez Vara, el Dr. Philippe Lobit y la M.C. Nuria Gómez-Dorantes.

**De los resultados de esta tesis se han publicado y presentado en foros académicos los siguientes trabajos:**

**Trabajos presentados en foros académicos:**

***V Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable***

Bautista-Villegas S., G. Rincón-Enríquez, E. E. Quiñones-Aguilar, N. Gómez-Dorantes, P. Lobit, J. N. Enríquez-Vara, C. Guízar-González, L. López-Pérez. 2018. Hongos micorrízicos arbusculares como promotores de crecimiento en plantas de chile Var. “chilaca”. V Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable. Zapopán, Jalisco, México; 3 al 5 de octubre. Presentación en Cartel.

Bautista-Villegas S., G. Rincón-Enríquez, E. E. Quiñones-Aguilar, N. Gómez-Dorantes, P. Lobit, J. N. Enríquez-Vara, C. Guízar-González, L. López-Pérez. 2018. Generación de una escala de daño de la mancha bacteriana en plantas de chile “chilaca”. V Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable. Zapopán, Jalisco, México; 3 al 5 de octubre. Presentación en Cartel.

***Seminario del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria 2018***

Bautista-Villegas S., G. Rincón-Enríquez, E. E. Quiñones-Aguilar, N. Gómez-Dorantes, P. Lobit, J. López-Pérez L. 2018. Efecto de hongos micorrízicos arbusculares y bacteriófagos contra la mancha bacteriana en chile “chilaca”. Seminario del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria 2018. Presentación oral.

**Publicaciones sometidas o publicadas en revistas científicas:**

***Revista Biotecnología y Sustentabilidad (ISSN: 2448-7562 (revista impresa))***  
***(<http://cienciasbiologicas.uaz.edu.mx/web/bas>).***

Bautista-Villegas S., G. Rincón-Enríquez, E. E. Quiñones-Aguilar, N. Gómez-Dorantes, P. Lobit, J. N. Enríquez-Vara, C. Guízar-González, L. López-Pérez. 2018. Hongos micorrízicos arbusculares como promotores de crecimiento en plantas de chile Var. “chilaca”. Revista Biotecnología y Sustentabilidad 3(suplemento): 34.

Bautista-Villegas S., G. Rincón-Enríquez, E. E. Quiñones-Aguilar, N. Gómez-Dorantes, P. Lobit, J. N. Enríquez-Vara, C. Guízar-González, L. López-Pérez. 2018. Generación de una escala de daño de la mancha bacteriana en plantas de chile “chilaca”. Revista Biotecnología y Sustentabilidad 3(suplemento): 95.

## **DEDICATORIA**

A mis padres: Genoveva Villegas Escutia y Jorge Bautista Loza por los valores inculcados, el apoyo y confianza en mí, por dejarme seguir mis objetivos y metas, y orientarme cuando lo necesité.

A mis hermanas: María del Carmen, Georgina, Julieta, Karina y Gisela por su apoyo incondicional, cariño y amor.

A mis sobrinas Carolina, Jimena, José Jorge, Luis Ángel e Ivonne Ileri por ser esa parte de mí que me llena de alegría y motivación para seguir adelante.

Por ser parte esencial de mi vida y mi motivación para superarme cada día.

## AGRADECIMIENTOS

- A mi familia y amigos que me han apoyado en todo momento y que me han ayudado llegar hasta la culminación de este trabajo de investigación.
- A Dr. Luis López Pérez y Dr. Gabriel Rincón Enríquez por su tiempo, paciencia y asesoría para llevar a cabo el trabajo de investigación.
- A el Dr. Philip Lobit, Dra. Evangelina Quiñones Aguilar, Mc. Nuria Gómez Dorantes, Dr. Jonhy Enríquez Vara y Cecilia Guízar González por las observaciones y comentarios durante todo este trabajo de investigación.
- A Cuauhtémoc Hernández, mi amigo y compañero, el cual ha sido un gran apoyo en todo este viaje, y que una vez más está presente en la culminación de una etapa importante de mi vida.
- A Kari Bautista, por su paciencia y apoyo en toda mi vida. Por su tiempo, escucharme, comprenderme y aconsejarme.
- Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) por haberme permitido desarrollar esta investigación, por la infraestructura y equipos para llevar a cabo el trabajo experimental.
- Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A. C. (CIATEJ) por la capacitación, infraestructura y equipos para llevar a cabo este trabajo de investigación.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría a través de la beca otorgada. Y al financiamiento del proyecto problemas nacionales CONACyT: 2015-01-338 y CIC-UMSN

## ÍNDICE

RESUMEN GENERAL.....	IX
ABSTRACT.....	XI
I.INTRODUCCIÓN.....	12
II.ANTECEDENTES.....	14
2.1 Generalidades del cultivo de chile.....	14
2.2 Mancha bacteriana del cultivo del chile.....	15
2.3 Control de la mancha bacteriana en el cultivo de chile.....	16
2.4 Control biológico de plagas y enfermedades.....	17
2.5 Bacteriófagos.....	18
2.6 Ciclo de vida de los bacteriófagos (fagos).....	19
2.7 Bacteriófagos utilizados en enfermedades bacterianas en plantas.....	20
2.8 Consideraciones para el uso de bacteriófagos en el control biológico de enfermedades bacterianas en plantas de interés agrícola.....	21
2.9 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	22
2.9.1 Ciclo de los Hongos Micorrízicos Arbusculares.....	23
2.9.2 Los HMA en la absorción de nutrientes.....	24
2.9.3 Los HMA como agentes de control biológico.....	25
2.10 Mecanismos de defensa de las plantas.....	26
2.10.1 Resistencia sistémica inducida.....	26
2.10.2 Resistencia sistemática adquirida.....	27
III.JUSTIFICACIÓN.....	28
IV.HIPÓTESIS.....	29
V.OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos.....	30
VI.RESULTADOS.....	31
6.1 Pruebas de patogenicidad de la cepa BV801 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en plantas de chile “Chilaca”.....	31
6.1.1 Resumen.....	31

6.1.2	Introducción .....	32
6.1.3	Metodología .....	32
6.1.4	Resultados .....	37
6.1.5	Conclusiones.....	44
6.1.6	Bibliografía.....	44
6.2	Generación de una escala para cuantificar el daño de la mancha bacteriana en chile “chilaca” .....	46
6.2.1	Resumen.....	46
6.2.2	Introducción .....	46
6.2.3	Metodología.....	47
6.2.4	Resultados .....	51
6.2.5	Conclusiones.....	60
6.2.6	Bibliografía.....	61
6.3	Hongos micorrizicos arbusculares y bacteriófagos en control del daño por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en chile “Chilaca” .....	63
6.3.1	Resumen.....	63
6.3.2	Introducción .....	64
6.3.3	Metodología .....	64
6.3.4	Resultados .....	75
6.3.4.1	Determinación del crecimiento y desarrollo por efecto de los HMA en plantas de chile bajo condiciones de invernadero .....	75
6.3.4.2	Experimento 1. Los HMA como promotores de crecimiento en plantas de chile “Chilaca”: invernadero en Zapopan, Jalisco. ....	75
6.3.4.3	Conclusiones experimento 1. Los HMA como promotores de crecimiento en plantas de chile “chilaca”: invernadero en Morelia, Michoacán. ....	83
6.3.4.4	Experimento 2. Efecto de los HMA y bacteriófagos en el control de la mancha bacteriana en chile chilaca .....	84
6.3.4.5	Evaluación de interacción Planta-Xcv-HMA y bacteriófagos en el crecimiento vegetal ..	89
6.3.4.6	Evaluación de los hongos micorrizicos arbusculares y bacteriófagos en control del daño causado por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en chile .....	92
6.3.4.6.1	Evaluación de los hongos micorrizicos arbusculares en el control de la mancha bacteriana.....	92
6.3.4.6.2	Bacteriófagos en el control de la mancha bacteriana .....	93

6.3.4.6.3 Efecto de bacteriófagos y HMA en la severidad de la mancha bacteriana en chile Chilaca en invernadero .....	95
6.3.4.6.4 Presencia de X. campestris pv. vesicatoria en tejidos enfermos .....	97
6.3.4.6.5 Presencia de bacteriófagos en los tejidos de las plantas .....	98
6.3.4.6.6 Colonización de los HMA en plantas de chile "chilaca" y densidad de esporas .....	100
6.3.5 Conclusiones.....	106
6.3.6 Bibliografía.....	107
6.4 DISCUSIÓN GENERAL.....	111
6.5. CONCLUSIÓN GENERAL .....	115
6.6. RECOMENDACIONES.....	115
VII BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA .....	116
VIII ANEXOS.....	122

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diseño de tratamientos evaluado la eficiencia de diferentes técnicas de inoculación y la fase de crecimiento bacteriano en el medio de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , en plantas de chile “Chilaca”. .....	34
Cuadro 2. Efecto de la técnica de inoculación, la fase de crecimiento de la cepa BV801 y su interacción en defoliación y hojas con manchas”, a los 21 días después de la inoculación con la cepa BV801 de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	40
Cuadro 3. Diseño de tratamientos en los que se evaluó la inoculación de Xcv en variedades de chile bajo diferentes condiciones ambientales para generar una escala ordinaria cualitativa de daño en chile.....	49
Cuadro 4. Diseño de tratamientos evaluados en el experimento de HMA como promotores de crecimiento y el efecto bioprotector de los HMA, bacteriófagos y sus combinaciones contra el daño ocasionado por la mancha bacteriana en chile “Chilaca” .....	65
Cuadro 5. Comparación de las variables de crecimiento y desarrollo en plantas de chile Chilaca a los 173 días después de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares ( <i>Rhizophagus intraradices</i> , <i>Funneliformis mosseae</i> , consorcio Las Campesinas) y sin la inoculación de HMA bajo condiciones de invernadero. ....	78
Cuadro 6. Comparación de las variables de crecimiento y desarrollo en plantas de chile “chilaca” a los 60 días después de la inoculación de diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares ( <i>Rhizophagus intraradices</i> (RI), <i>Funneliformis mosseae</i> (FM), consorcio “Las Campesinas” (CAM) y sin la inoculación de HMA (sin HMA)...	86
Cuadro 7. Efecto de los factores de estudio: HMA, <i>Xanthomonas</i> y bacteriófagos y sus interacciones en las variables de crecimiento en plantas de chile “chilaca”, 60 días después del trasplante. ....	89
Cuadro 8. Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares en la severidad de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en plantas de chile “Chilaca” en condiciones de invernadero. ....	92
Cuadro 9. Efecto de bacteriófagos en severidad de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> en plantas de chile “Chilaca” .....	94
Cuadro 10. Efecto de los factores de estudio (HMA, <i>Xanthomonas</i> y bacteriófagos) y sus interacciones en las variables microbiológicas en plantas de chile “Chilaca” 60 días después del trasplante. ....	100
Cuadro 11. Comparación de medias de porcentaje de colonización y densidad de esporas de en plantas de chile “chilaca” a los 60 días después de la inoculación de diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares ( <i>Rhizophagus intraradices</i> (RI), <i>Funneliformis</i> (FM), consorcio “Las Campesinas” (CAM) y sin la inoculación de HMA (sin HMA).....	101
Cuadro 12. Efecto de HMA, <i>Xanthomonas</i> y bacteriófago en la densidad de esporas en el sustrato y colonización micorrizica en las raíces en plantas de chile “chilaca” a 60 días después de la inoculación de los HMA. ....	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo típico de los bacteriófagos líticos en una célula bacteriana. (Ilustración: Casta-Feletti, 2009).....19
- Figura 2. Detalle de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv por la técnica de aspersión: (a) aspersión por el envés; (b) aspersión por el haz).....36
- Figura 3. Desarrollo de la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) en chile chilaca a través del tiempo. Los recuadros señalan el día después de la inoculación en el que presentó el síntoma. ....38
- Figura 4. Aspecto de planta inoculada con la técnica de microabrasión 21 días después de la infección. La flecha indica la hoja en la que se realizó la inoculación. ....38
- Figura 5. Efecto del método de inoculación de la cepa BV801 de Xcv, en defoliación y número de hojas que presentaron daño de la mancha bacteriana, en plantas de chile “chilaca” en condiciones controladas con temperatura a 25°C y humedad relativa del 90%. Fase bacteriana: estacionaria (Est); exponencial (Exp), Técnica de inoculación; (1) aspersión haz, (2) envés, (3) haz-envés; (4) microheridas y (5) herida. Las barras en rectángulos indican el error estándar. Letras distintas por columna indican diferencias significativas según Tukey ( $P \leq 0.05$ ). ....41
- Figura 6. Características morfológicas de las cepas recuperadas de tejidos enfermos de diferentes tratamientos y la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (BV801); Tratamiento de aspersión haz-envés en fase de crecimiento estacionaria (Est. 3).....42
- Figura 7. Comparación molecular de la longitud del fragmento intergénico ribosomal 16S-23S (ITS) amplificado de la cepa BV801 de Xcv y las bacterias aisladas de tejidos enfermos. Marcador molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) (BMP), BV.801 cepa BV801, técnica de aspersión haz- envés en fase bacteriana exponencial (Exp.3), técnica de aspersión haz- envés en fase bacteriana estacionaria (Est.3), técnica de aspersión envés en fase de crecimiento exponencial (exp.2), técnica de aspersión haz en fase de crecimiento estacionaria (est.1).....43
- Figura 8. Condiciones donde se colocaron las plantas de chile “chilaca” y variedad San Luis después de la inoculación de *Xanthomonas*, recuadros indican la clave de cada condición. ....51
- Figura 9. Desarrollo de la mancha bacteriana en chile, chilaca a través del tiempo. Los recuadros señalan el día después de la inoculación en el que presentó el síntoma. 52

Figura 10. Escala ordinal cualitativa de daño en plantas de chile variedad “chilaca”; números señalan en nivel de daño. ....	53
Figura 11. Daño de la mancha bacteria en hojas a los 22 días después de la inoculación de Xcv, en condiciones de laboratorio sin alta humedad. Rectángulos indican la hoja correspondiente a cada variedad de chile: variedad chilaca (CH), variedad San Luis (SL).....	54
Figura 12. Daño de la mancha bacteria en hojas a los 22 días después de la inoculación de Xcv en condiciones invernadero sin alta humedad. Rectángulos marcan la hoja correspondiente a cada variedad de chile: variedad chilaca (CH), variedad San Luis (SL).....	55
Figura 13. Desarrollo de la mancha bacteriana en chile a través del tiempo. Números en los círculos indican el día después de la inoculación en el que se manifestó el síntoma; variedad San Luis (SL); variedad “Chilaca” (CH).....	56
Figura 14. Daño de la mancha bacteriana en hojas de los 10 a 16 días después de la inoculación, en chiles de las variedades; variedad Chilaca (CH) y San Luis (SL). Los óvalos indican los días después de la inoculación en el que se presentó el daño. ...	57
Figura 15. Escala ordinal cualitativa de daño en plantas de chile variedad Chilaca; números señalan en nivel de daño. ....	59
Figura 16. Características morfológicas de la cepa BV801 y las cepas aisladas de tejidos enfermos en las diferentes condiciones en las que se realizó la inoculación: cepa BV801 (801); cepas aisladas de las condiciones de invernadero (Inv); indica la cepa aislada de las condiciones LS (Lab1), cepa aislada de las condiciones LH (Lab 2 ). .....	60
Figura 17. Efecto de los bacteriófagos encapsulados, sin encapsulados y el encapsulado (sin fago) a la cepa bacteriana Xcv en ensayo de doble placa en agar suave:(1). Lisis de los bacteriófagos sin encapsular; (2). Lisis de los bacteriófagos encapsulados con alginato de sodio al 3% y (3). Únicamente el encapsulado (sin fago) con agua estéril; números indican las diluciones decimales.....	69
Figura 18. Detalle de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv y bacteriófagos en las plantas de chile chilaca: (a) Inoculación de la cepa BV801; (b) Inoculación de la solución del bacteriófagos XAF18, 24 h después de la inoculación de Xcv.....	71
Figura 19. Comparación de la evolución de la altura de las plantas por efecto de la inoculación de HMA. Inóculos: RI (Rhizophagus intraradices), FM (Funneliformis mosseae), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA (sin la inoculación de HMA) a partir de los 2 hasta los 173 días después de la inoculación de los HMA en condiciones de invernadero. Análisis estadístico Tukey (P≤0.05).....	76

- Figura 20. Evolución de crecimiento de diámetro del tallo (DT) a través de tiempo por efecto de la inoculación de HMA. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funnelformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA. En condiciones de invernadero. Análisis estadístico por el factor HMA ( $P \leq 0.05$ , Tukey). .....77
- Figura 21. Colonización micorrízica con los diferentes inóculos de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en raíces de chile chilaca a 173 días después de inoculadas en condiciones de invernadero. *Rhizophagus intraradices* (R.I), *Funnelformis mosseaea* (F.M), Las Campesinas (CAM) y sin inóculo (sin HMA). Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey ( $P \leq 0.05$ ). .....80
- Figura 22. Densidad de esporas de los hongos micorrízicos arbusculares inoculados a 173 días después de inoculadas en plantas de chile “Chilaca”, en condiciones de invernadero. Inóculos evaluados: *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funnelformis mosseaea* (FM), Las Campesinas (CAM) y sin inóculo (sin HMA). Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas, Tukey ( $P \leq 0.05$ ). .....82
- Figura 23. Evolución de la altura de las planta por efecto de la inoculación de HMA a través del tiempo. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funnelformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA (sin la inoculación de HMA), en condiciones de invernadero. Análisis estadístico por factor HMA ( $P \leq 0.05$ , Tukey). .....84
- Figura 24. Evolución de diámetro del tallo por efecto de la inoculación de HMA. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funnelformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA (sin la inoculación de HMA), en condiciones de invernadero. Análisis estadístico para los niveles del factor HMA. Letras diferentes muestran diferencias significativas a los 60 días después de la inoculación de los HMA según Tukey, ( $P \leq 0.05$ ). .....85
- Figura 25. Colonización de los hongos micorrízicos arbusculares en plantas de chile Chilaca a los 60 días después de inoculadas, en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas, Tukey ( $P \leq 0.05$ ). .....87
- Figura 26. Densidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en 100 g de sustrato a los 60 días después de inoculadas en plantas de chile “Chilaca” en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas según Tukey ( $P \leq 0.05$ ). .....89

- Figura 27. Altura de la planta antes de la infección de Xcv (39 días de crecimiento) y después de la inoculación (60 días de crecimiento y 21 días después de la inoculación), barras en los puntos indican el error estándar, letras distintas indican diferencias significativas Tukey ( $P \leq 0.05$ ). .....91
- Figura 28. Efecto de la inoculación de HMA, bacteriofagos y su combinación en la defoliación provocada por Xcv, claves de tratamientos: Inoculos de HMA; *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (GM), Las Campesinas (CA), con Xcv; X, con bacteriófago; B. En plantas de Chile Chilaca en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas según Tukey ( $P \leq 0.05\%$ ). .....96
- Figura 29. Efecto de la inoculación de HMA, bacteriofagos y su combinación en el área foliar enferma provocada por Xcv, claves de tratamientos: Inoculos de HMA; *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (GM), Las Campesinas (CA), con Xcv; X, con bacteriófago; B, en plantas de Chile Chilaca en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey ( $P \leq 0.05\%$ ).....97
- Figura 30. Comparación de las cepas bacterianas de los tratamientos donde se inoculó a *Xanthomonas* con la cepa BV801. El número de la placa corresponde al tratamiento de donde se aisló la cepa, (801) corresponde a la cepa control (BV801). .....98
- Figura 31. Detención de los bacteriófagos en el ensayo doble placa en agar suave para verificar la presencia o ausencia de estos virus en tejidos de la planta de los diferentes tratamientos. Sin Xcv indica los tratamientos donde no se inoculó *Xanthomonas* pero sí se colocaron bacteriófagos; con Xcv, indica los tratamientos donde se inoculó *Xanthomonas* y sus bacteriófagos correspondientes. T: indica el tratamiento de origen; números indican la dilución decimal. ....99
- Figura 32. Comparación entre las interacciones entre los niveles de hongos micorrízicos arbusculares y la inoculación de la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de acuerdo a Tukey, ( $P \leq 0.05$ ). ..... 102
- Figura 33. Comparación entre las interacciones entre los niveles de hongos micorrízicos arbusculares y la inoculación del bacteriófago XAF18 de acuerdo a Tukey, ( $P \leq 0.05$ ). ..... 103
- Figura 34. Estructuras fúngicas de los HMA dentro de las raíces de plantas de Chile: (a) Vesícula, (b) espora y (c y d) arbuscúlos. Vistas tomadas con aumento de 40x. .... 104

## RESUMEN GENERAL

En este trabajo se evaluó el efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), bacteriófagos, y su combinación contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) en plantas de chile. En condiciones controladas, se realizó un ensayo de patogenicidad para determinar la mejor técnica de inoculación del patógeno sobre la planta, posteriormente se realizaron ensayos para generar una escala ordinal cualitativa del daño de la enfermedad, en diferentes condiciones ambientales. Se evaluó el potencial de crecimiento y bioprotección contra enfermedades de hongos micorrízicos en plantas de chile y finalmente se estableció un ensayo donde se evaluó la interacción entre HMA, Xcv y bacteriófago, en plantas de chile. Los resultados del primer ensayo mostraron que, la dosis  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> provocó síntomas de enfermedad y que la solución bacteriana preparada en fase de crecimiento estacionaria y aplicado por aspersion al haz y envés de la hoja fue el método más eficiente para promover la infección de Xcv. De acuerdo a la variación sintomática presentada por la mancha bacteriana en plantas de chile bajo diferentes condiciones ambientales, se generaron dos escalas ordinales de severidad de la enfermedad. La primera con seis niveles y la otra con cuatro niveles. Así mismo, se encontró que las plantas de chile inoculadas con el HMA CAM, tuvieron un 41% de colonización micorrízica y presentaron un mayor tamaño de planta y número de órganos reproductivos respecto a las plantas sin HMA. La micorrización con *Rhizophagus intraradices* (RI) aumentó el número de hojas y disminuyó la defoliación provocada por la mancha bacteriana (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). La combinación RI+bacteriófago mostró disminuir significativamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) la defoliación de las plantas infectadas mientras que plantas micorrizadas con CAM disminuyeron el área foliar enferma en relación a las plantas sin tratamiento. Por lo anterior se puede concluir que los bacteriófagos combinados con *Rhizophagus intraradices* potencialmente tienen efecto en promoción de crecimiento y disminución de daño causado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile “Chilaca” bajo condiciones de invernadero.

**Palabras clave:** patogenicidad, inoculación, escala ordinal cualitativa del daño, severidad,

Hongo micorrízico arbuscular.

## ABSTRACT

In this work, the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), bacteriophages and their combination against *Xanthomona campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) in pepper plants. Under controlled conditions, a pathogenicity test was carried out to determine the best technique to inoculate the pathogen in the plant, then an ordinary qualitative pathogenicity test was carried out on the disease damage, under different environmental conditions. The potential for growth and bioprotection against mycorrhizal fungi diseases in pepper plants is evaluated and, finally, an assay is provided where the interaction between AMF, Xcv and bacteriophages in pepper plants is evaluated. The results of the first trial indicate that the dose of  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> caused the symptoms of the disease and that the bacterial solution prepared in the phase of bacterial growth stationary in the medium, and applied by spraying to the ray and back, was the more efficient to promote Xcv infection. According to the synthetic variation of the bacterial spot, in the plants of the different environmental conditions, two damage scales were generated. The first with six levels and the other with four levels of severity. Likewise, it has been found that the pepper plants inoculated with the native mycorrhizal inoculum CAM, had a 41% colonization of mycorrhizae and a larger plant size and several reproductive organs with respect to the plants without AMF. The mycorrhization with *Rhizophagus intraradices* the number of leaves, and decreases the defoliation caused by the bacterial spot. The combination of the RI + bacteriophage decreased the defoliation of the infected plants, and the mycorrhizal plants with CAM had an effect in reducing the diseased area leaf in relation to the untreated plants. Therefore, it can be concluded that bacteriophages combined with *Rhizophagus intraradices* potentially have effect in promoting growth and reducing damage caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper plants "Chilaca".

**Index words:** pathogenicity, inoculation, qualitative ordinal scale of damage, severity, arbuscular mycorrhizal fungus.

## I. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annum* L.) es una hortaliza, utilizada en la elaboración de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos. El fruto del chile es de gran demanda en los mercados internacionales y de gran importancia económica en los países productores. México es el segundo país con mayor exportación de chile verde y el décimo segundo en chile seco. En el 2017 la producción de chile fue de 3 296 875 Ton con un valor de \$ 29 125 313.740 de pesos, lo que lo posiciona como la segunda hortaliza con mayor importancia económica (SAGARPA, 2017). Sin embargo, la producción de chile se enfrenta a problemas fitosanitarios importantes, que disminuye el rendimiento de la producción y ocasionan pérdidas económicas importantes. Tal es el caso de las enfermedades, principalmente las causadas por hongos y bacterias. Entre éstas, destaca la mancha bacteriana causada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), considerada de las más devastadoras, puede causar 50% de pérdidas en el rendimiento (Balogh *et al.*, 2018). Esta enfermedad se manifiesta como pequeñas manchas cloróticas que cambian a color marrón o necróticas, ataca todas las partes vegetativas y provoca una defoliación severa de la planta (Shultz y French, 2011; Hernández, 2012). La mancha bacteriana tiene presencia en las principales regiones productoras de chile de México (Carrillo, 2001).

Para el control de esta enfermedad convencionalmente se utiliza el control químico con productos a base de cobre y antibióticos como la estreptomicina, kasugamicina (Hernández, 2012). Sin embargo, el uso constante de estos productos ocasionan resistencia al agente causal de la enfermedad (Carrillo *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2012), además de contaminación al medio ambiente (suelo, aire y agua), problemas a la salud humana, entre otros. Por lo anterior, se buscan otras opciones de control que permitan un manejo integral de la enfermedad y sean eficientes para prevenir y detener la propagación de la mancha bacteriana.

Unas de las opciones viables que actualmente se están promoviendo, es el control biológico; este se basa en el uso de microorganismos para el control de plagas y enfermedades. El uso de agentes biológicos como bacterias, bacteriófagos,

hongos micorrízicos arbusculares (HMA), entre otros se han reportado como herramientas eficaces para el control de enfermedades. Los bacteriófagos son virus específicos de bacterias capaces de fijarse a esta, reproducirse dentro de ella y finalmente destruir la bacteria fitopatógena (Gaviria, 2012; Quiñones *et al.*, 2014). Por otra parte, los HMA son microorganismos que establecen una simbiosis mutualista con aproximadamente el 80% de las plantas vasculares. Mejoran el estado nutricional de la planta, haciéndola más tolerante a factores bióticos y abióticos, además de inducir los mecanismos de defensa de la planta de manera local y sistemática (Pozo *et al.*, 2002; Galindo, 2008). A cambio la planta ofrece a los HMA los carbohidratos necesarios para cumplir su ciclo de vida (Smith y Read, 2008).

Trabajos de investigación muestran evidencia de la disminución del daño de la mancha bacteriana utilizando estos dos microorganismos de manera independiente (Balogh *et al.*, 2002; López *et al.*, 2016; Galindo, 2008; Gonzáles, 2012); sin embargo, hasta ahora no hay ninguna investigación en la que se haya estudiado la combinación de estos dos microorganismos contra la enfermedad. Con el propósito de desarrollar estrategias de manejo sustentables para reducir el daño de la mancha bacteriana en Chile, en esta investigación se estudió la combinación de bacteriófagos y HMA, sobre el control de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas Chile. Bajo condiciones de invernadero, se cultivaron plantas de Chile variedad "chilaca", donde se evaluó el efecto simple y combinado de la inoculación con cepas de HMA y un bacteriófago contra la mancha bacteriana, se encontró que la micorrización de las plantas con HMA tuvieron un efecto positivo en el crecimiento de las plantas. Las plantas micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* (RI) presentaron menor defoliación en relación a las plantas sin HMA, el bacteriófago por sí solo no tuvo efecto en el control de la enfermedad. El tratamiento de la combinación RI y bacteriófagos disminuyeron la defoliación de las plantas enfermas en relación a las plantas donde solo se aplicó Xcv. Las plantas del tratamiento inoculadas con el consorcio Las Campesinas (CAM), presentaron menor área foliar dañada en relación al tratamiento sin tratar. Los resultados de este trabajo son relevantes y con potencial en la búsqueda de

una estrategia sustentable para el control de la mancha bacteriana del cultivo de chile.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del cultivo de chile

El chile es una hortaliza de la familia de las solanáceas del género *Capsicum*, originario de Mesoamérica y México. De comportamiento anual o perenne, planta monoica de raíz pivotante, semi-arbusto de forma variable con altura de 0.6 a 1.5 m. El fruto es una baya, con dos a cuatro lóbulos de forma globosa, rectangular, cónica o redonda, de tamaño variable al igual que su color; estas características dependen de la variedad, de las condiciones climáticas y del manejo (Cruz, 2005).

El cultivo de chile tiene gran importancia en todo el mundo, sus frutos se consumen frescos, deshidratados o procesados (Aguilar *et al.*, 2010). Los principales países productores de chile verde son: China con 17 821 238 Ton, seguido por México con una producción de 3 296 875 Ton y en tercer lugar Turquía con 2 608 172 Ton, en tanto a producción de chile seco son: India con una producción de 2 096 000, segundo puesto lo ocupa Tailandia con 349 615 y el tercer puesto China con 313 997 Ton, mientras que México ocupa el lugar décimo segundo con 61 365 Ton (FAOSTAD, 2017).

En México, es utilizado en una gran variedad de platillos característicos de la cocina mexicana (Aguilar *et al.*, 2010). Existen 64 variedades de chile distribuidas en todo el territorio, siendo México el país con mayor diversidad de esta especie vegetal (Aguilar *et al.*, 2010). El chile es la segunda hortaliza con mayor importancia económica, únicamente superada por el cultivo del jitomate (*Solanum lycopersicum*). En el 2018, su producción fue de 3 290 655.05 Ton lo que representó un valor de producción de \$ 29 125 313 740 pesos. Los principales estados productores de chile son; Chihuahua con 820 626.21 Ton, Sinaloa con 701 191.36, Zacatecas con 417 217.83 Ton, Michoacán ocupa el séptimo puesto con una producción de 119 215.83 Ton que representó un valor de producción de

1290 655 050 de pesos. En Michoacán los principales municipios en producción de chile son: Yurécuaro con 50 764 Ton, Tanhuato con 26 390 Ton y Zamora con 13 131 Ton (SAGARPA, 2019).

Quérendaro es un municipio cercano a la capital michoacana que se caracteriza por su producción de chile criollo variedad pasilla comúnmente llamado “chilaca”, con 115 ha destinadas a esta actividad. El rendimiento promedio en este municipio es de 4.50 Ton ha<sup>-1</sup>, muy por debajo de la media nacional que es de 19.28 Ton ha<sup>-1</sup> (SAGARPA, 2019).

El sistema de producción de chile se enfrenta a diversas problemáticas que limitan su producción como factores climáticos (lluvia, heladas, sequías, vientos), y problemas fitosanitarios, principalmente las enfermedades provocadas por hongos y bacterias, que frecuentemente atacan al cultivo afectando su rendimiento (Guevara y Estrella, 2008). La mancha bacteriana causada por *Xanthomonas* es considerada una de las más limitante en la producción debido a que ataca todas las partes de la planta (cc, 2010; Lara, 2015) y en condiciones favorables produce pérdidas de hasta el 50% de la producción (Carrillo *et al.*, 2001).

## **2.2 Mancha bacteriana del cultivo del chile**

El agente causal de la mancha bacteriana fue aislado por primera vez en 1921. En un principio se consideró como una única especie de *Xanthomonas* (Doidge) Dye la que provocaba la enfermedad, sin embargo, en estudios recientes basados en la comparación de secuencias nucleótidas se han identificado cuatro grupos de *Xanthomonas* que afectan principalmente los cultivos de chile y jitomate (*Solanumlycopersicum*): *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforantsy* *X. gardneri* (Jones *et al.*, 2004).

*Xanthomonas campestris* (Xc) es una bacteria baciliforme, móvil, Gram negativa, con un flagelo polar, aerobio estricto (Jones, 1998). Xc se caracteriza por la producción de xantano, un polisacárido que le da una pigmentación amarilla y consistencia mucoide (Stall, 1993).

Las principales fuentes de inóculo son semillas contaminadas, trasplantes infectados y malezas. La bacteria puede sobrevivir en el suelo en los residuos de cosechas anteriores. Las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad son temperaturas de 25 a 30°C y humedad relativa >60% (Shultz y French, 2011; Hernández, 2012). La enfermedad se propaga con facilidad por la diseminación de las bacterias por acción de las labores culturales, viento, lluvia e insectos (García y Pérez, 2009; Ritchie, 2000).

De manera natural el ciclo de vida de *Xanthomonas* sp. se divide en tres etapas: saprofita, epifítica y patogénica: en la etapa saprofita las bacterias se encuentran en las semillas y/o en hospedantes externos (malezas, residuos de cosechas anteriores, etc.) en un estado de metabolismo reducido (hipobiótico); durante la etapa epifítica la bacteria se encuentra en la superficie de las hojas, se multiplica lo suficiente para sobrevivir hasta que las condiciones sean favorables para el desarrollo de la infección y en la etapa patogénica la bacteria, al encontrar condiciones favorables, penetra al interior de la planta a través de aberturas naturales como estoma e hidátodos o por heridas. Una vez adentro comienza su multiplicación exponencialmente y los síntomas en la planta se manifiestan (Galindo, 2008).

Los síntomas pueden aparecer en cualquier etapa fenológica del cultivo y se presentan como manchas angulares en las hojas, tallos y frutos. Inicialmente se observan manchas acuosas, a veces rodeadas por un halo clorótico; las lesiones se desarrollan rápidamente en tamaño y adquieren una coloración café y apariencia necrótica. Las lesiones a menudo son más numerosas en la punta y el margen de la hoja debido a la acumulación de humedad, provocando defoliación, muerte de flores, manchado del fruto y cuando el ataque es muy severo, la muerte de la planta (Ritchie, 2000).

### **2.3 Control de la mancha bacteriana en el cultivo de chile**

Convencionalmente el manejo de la enfermedad puede lograrse mediante la integración de prácticas culturales y el control químico.

Las prácticas culturales se centran principalmente en la prevención de la enfermedad. Estas prácticas incluyen el uso de semillas certificadas, desinfección de semillas, destrucción de restos de cosechas anteriores, rotación de cultivos y evitar exceso de humedad y encharcamientos (Kuchare, 1994; Quezado *et al.*, 2003).

Por otro lado, el control químico se basa en la aplicación de compuestos como: la estreptomicina, kasugamicina y otros a base de cobre (Hernández, 2012). Sin embargo, su uso constante han ocasionado resistencia al agente causal de la enfermedad, lo que hace costoso e ineficiente este control (Carrillo *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2012). En 1960 en Florida se tuvieron los primeros reportes de resistencia de *Xanthomonas* spp. a la estreptomicina; más tarde en 1982 nuevamente en Florida se informó la resistencia al cobre. Entre 1999 y 2001 se reportó la resistencia a estos compuestos en América central y el Caribe (Araujo *et al.*, 2012). En el estado de Sinaloa una de las zonas más importantes de producción de chile y jitomate del país, también se tienen identificadas *Xanthomonas* spp. con resistencia al cobre y la estreptomicina (Carrillo *et al.*, 2001).

Además, la aplicación de estos productos químicos tiene efectos negativos sobre el medio ambiente como la contaminación de suelos y ríos, la eliminación de microfauna benéfica para el desarrollo de las plantas. Además, la presencia de residuos en los frutos puede provocar daños a la salud de los consumidores. De ahí la importancia de implementar medidas menos dañinas para controlar la enfermedad como el control biológico, que es un control natural contra plagas y enfermedades (Rodríguez y Arredondo, 2007).

#### **2.4 Control biológico de plagas y enfermedades**

El control biológico es un método natural para el control de plagas y enfermedades en cual se utilizan enemigos naturales de los microorganismos fitopatógenos. Representa una alternativa o complemento de otros métodos de control que promueve la disminución del uso de productos químicos como insecticidas y

plaguicidas, además de no favorecer la resistencia en los agentes patógenos (Badii, 2006). El control biológico tiene ventajas como el poco o nulo efecto nocivo colateral; no contamina el ambiente, existen pocos casos de resistencia, control a largo plazo y sobre todo, no deja residuos en los alimentos y no afecta la salud humana (Rodríguez y Arredondo, 2007). En el caso de control biológico de la mancha bacteriana del cultivo de solanáceas se recomienda el uso de bacteriófagos, que son virus específicos de bacterias (Hernández, 2012; Quiñones *et al.*, 2014), hongos micorrizicos arbusculares que mejoran estado nutricional de la planta e inducen su sistema de defensa (Correón, 2008; Galindo, 2008), bacterias como *Bacillus* sp (Monteiro *et al.*, 2005), rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) inductoras del sistema de resistencia inducido en plantas (RSI) (Liu *et al.*, 1995; Obradovic *et al.*, 2005).

## **2.5 Bacteriófagos**

Son virus obligados y específicos de una célula bacteriana, es decir que necesitan estar intracelularmente para reproducir su material genético, utilizan la maquinaria bacteriana para replicarse y posteriormente lisar la célula para continuar con su ciclo (Gómez y Vives, 2009). El genoma viral es constituido por ARN o ADN, el material genético está protegido por una “cápside” que es una cubierta proteica (Segundo *et al.*, 2010). Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1915 por Frederick W. Twort, quien reportó que una enzima bacteriana provocaba la lisis de la bacteria. De manera independiente, en 1917 D’Herelle especuló que era un virus bacteriano el que provocaba dicho fenómeno, pero no se pudo comprobar esta especulación hasta tres décadas más tarde. Sin embargo, fue a partir de este concepto se comenzó el estudio de los bacteriófagos como agente de control de enfermedades bacterianas (Jones *et al.*, 2007). D’Herelle en los siguientes años, continuó con las investigaciones con bacteriófagos en pollos y humanos para el control de la enfermedad disentería, en 1922 Richard Brunoghe y Maisin reportaron el control de infecciones por *Bacillus anthracis* y *Staphylococcus* con el tratamiento de bacteriófagos (Nallelyt *et al.*, 2010). En los siguientes 40 años se

reportaron más de 800 artículos relacionados con los bacteriófagos (Jones *et al.*, 2007).

## 2.6 Ciclo de vida de los bacteriófagos (fagos)

De acuerdo con Gómez y Vives (2009) y Segundo *et al.* (2010) hay dos tipos de ciclos de vida de los fagos: el lítico y el lisogénico. El ciclo lisogénico se diferencia en que después de la penetración del virus a la célula bacteriana, el ácido nucleico del fago se inserta en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria por una o varias generaciones sin mayores consecuencias metabólicas para las bacterias, pero después de un tiempo, finalmente rompe la bacteria y se convierte en un ciclo lítico (Fig. 1).

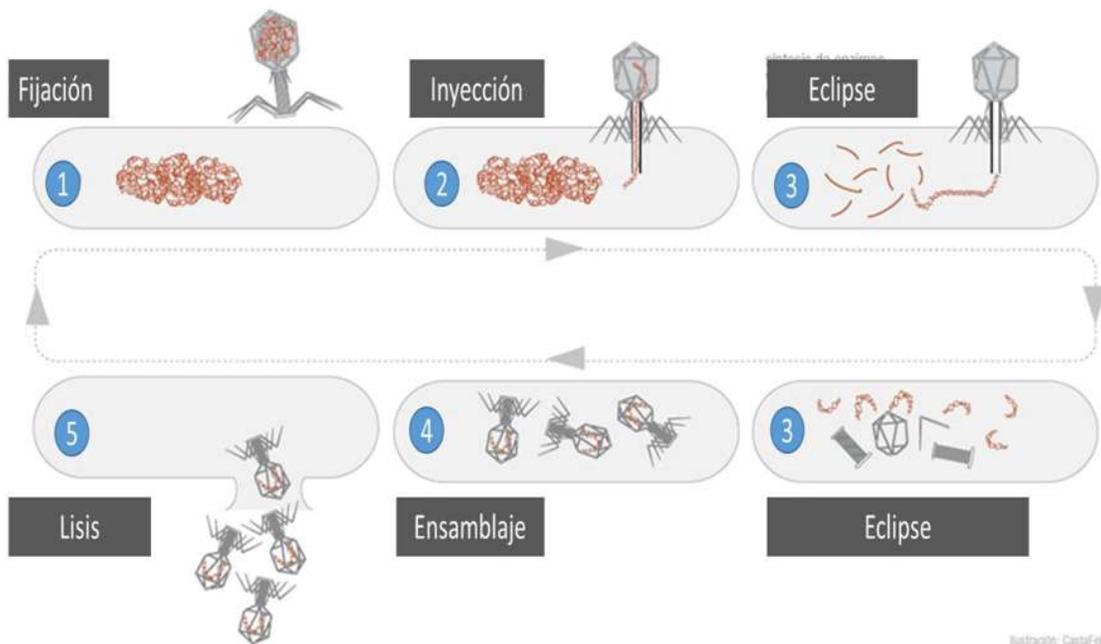


Figura 1. Ciclo típico de los bacteriófagos líticos en una célula bacteriana. (Ilustración: Casta-Feletti, 2009).

El ciclo lítico de vida de los fagos de acuerdo con Gómez y Vives (2009), se describe a continuación (Fig. 1):

**Fijación.** El ciclo comienza cuando el fago se fija a la célula específica. Esto sucede cuando el bacteriófago reconoce receptores (proteínas o carbohidratos) específicos en la superficie bacteriana.

**Inyección.** El virus inyecta en la célula su material genético.

**Eclipse.** El virus activa la síntesis de sus propias proteínas y detiene la de las proteínas bacterianas. Las proteínas virales sintetizadas estimulan la replicación del genoma viral y la transcripción de los genes intermedios y tardíos (genes que se expresan a la mitad y al final del ciclo, respectivamente) mediante sucesivas modificaciones de la polimerasa y el reconocimiento de los respectivos promotores del fago. Las nucleasas codificadas por el virus digieren el cromosoma de la bacteria hospedera para proveer los nucleótidos necesarios en la síntesis del genoma del fago.

**Ensamblaje.** Se empaquetan los ácidos nucleicos dentro de las cápsides de los bacteriófagos recién formados. En los genes tardíos se encuentran las proteínas estructurales y de ensamblaje de los virus, además de enzimas que ayudan a degradar la pared bacteriana.

**Lisis.** Se lisa la célula y se liberan los fagos que se fijaron en las células bacterianas más cercanas.

## **2.7 Bacteriófagos utilizados en enfermedades bacterianas en plantas**

Silva (2012), utilizó bacteriófagos VCSM13 solos y unidos a péptidos líticos contra la enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*) en condiciones de invernadero, en dos variedades de vid: Cabernet Sauvignon y Red Globe, las cuales se infectaron artificialmente. Los bacteriófagos que se aplicaron directamente al sistema vascular mostraron actividad en contra de este patógeno. Lara (2015), estudió *in vitro* el control de la mancha negra (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum*) utilizó mezclas de bacteriófagos que controlaron y detuvieron la proliferación bacteriana patogénica tanto en medios de cultivo líquidos como medios sólidos. Mendoza (2015), aisló el agente fitopatógeno

causante del tizón de halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) en campos donde se cultiva frijol y aisló bacteriófagos nativos capaces de lisar esta bacteria. En total aislaron 12 bacteriófagos y 18 cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *In vitro* encontró que cinco cepas fueron sensibles a los bacteriófagos que se aislaron. López (2016), evaluó el uso de bacteriófagos líticos específicos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) para el control de la mancha bacteriana en chile (*Capsicum annuum* L.), evaluó en cepas de Xav aisladas en Mascota, Jalisco, Yurécuaro Michoacán y Zacatecas, con bacteriófagos nativos. En invernadero se observó efecto sobre el control de la mancha bacteriana cuando se aplicaron bacteriófagos a plantas enfermas (24 h después de la infección con Xav).

Los bacteriófagos son altamente específicos, solo eliminan la bacteria objetivo, por lo que se puede acoplar con la aplicación de otros agentes de control biológico (Balogh, 2005).

## **2.8 Consideraciones para el uso de bacteriófagos en el control biológico de enfermedades bacterianas en plantas de interés agrícola**

Para el éxito del uso de bacteriófagos en plantas es necesario tener en cuenta que los bacteriófagos son específicos de cada bacteria, por lo que es importante una buena selección del fago para combatir a la bacteria de interés (Abedon, 2012). Otra limitante es que la bacteria puede generar resistencia ante el fago (Gavira, 2012; Abedon, 2012). Por otro lado, los fagos son sensibles a varios factores ambientales, principalmente a exposición a los rayos UV, temperaturas mayores a 28°C y desecación (Iriarte, 2007). Balogh *et al.* (2003) realizaron un experimento en invernadero en el que evaluaron diferentes formulaciones para bacteriófagos a partir de leche descremada, sacarosa y harina de maíz pregelatinizada para controlar *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en jitomate, encontraron que el uso de formulaciones con fagos logró aumentar la longevidad de estos y resultó en mayor eficacia en el control de enfermedades bacterianas. Iriarte *et al.* (2007), también encontraron, que, al aplicar fagos en formulaciones con leche descremada sobre hojas de jitomate expuestas a diferentes condiciones de temperatura, rayos UV y humedad, los bacteriófagos formulados tenían una mayor

actividad lítica a través del tiempo en la superficie de la hoja. Sin embargo, el uso de estas formulaciones puede tener contradicciones por el contenido de carbohidratos y nitrógeno, estos sirven como alimento para las bacterias y puede atraer a otros patógenos (Gasic, 2016). Otras técnicas de protección de los fagos consisten en la encapsulación del fago con alginato. Colom *et al.* (2017), realizaron el primer experimento utilizando bacteriófagos encapsulados con alginato  $\text{CaCO}_3$  como terapia oral para pollos de engorde infectados con Salmonela. La encapsulación demostró proteger los bacteriófagos contra su destrucción por el jugo gástrico. Cruz (2018) aplicó bacteriófagos encapsulados con alginato de sodio en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) contra el tizón del halo (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) en condiciones de invernadero. El encapsulado protegió al fago contra los factores ambientales.

## **2.9 Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)**

Los HMA, son microorganismos que forman una asociación mutualista con las raíces de las plantas. El término “micorriza” viene del vocablo griego que significa: *myco*: hongo y *rhiza*: raíz”, fue empleado por primera vez por el patólogo forestal A. B Frank en 1885 al observar estos microorganismos en la raíz de un gran árbol (Smith y Read, 2008). Esta asociación simbiótica mutualista es compatible con el 80% de las familias de plantas vasculares (Ramírez y Rodríguez, 2010), el hongo es un simbiote obligado que recibe de la planta carbohidratos para cumplir su ciclo de vida, mientras la planta es un simbiote facultativo en el que no depende del HMA para su desarrollo, pero se ve beneficiada por el hongo en la explotación eficaz de los recursos minerales del suelo principalmente de fósforo, además que induce los mecanismos de defensa de la planta contra una serie de patógenos, mejora la microfauna del suelo (Camarena, 2012), regulan la actividad metabólica de la raíz e influyen en las propiedades físicas y químicas del suelo (Sarabia *et al.*, 2010). Los HMA reciben este nombre porque sus hifas penetran en las células corticales donde se forman estructuras en forma de arbolitos (Jaramillo *et al.*, 2004), estas estructuras son el sitio de intercambio de fósforo, carbono, agua y

otros nutrientes y están conectadas por hifas extracelularmente que permiten una mejor adsorción de los nutrimentos del suelo (Ramírez, 2010).

### **2.9.1 Ciclo de los Hongos Micorrízicos Arbusculares**

Las esporas de los HMA, son células reproductivas producidas asexualmente, pueden permanecer en el suelo durante un largo periodo de tiempo hasta que las condiciones sean favorables para su germinación (Barrer, 2009). En muchas de las especies de HMA, las esporas germinan sin necesidad de factores de la planta y las hifas se ramifican en múltiples direcciones para incrementar las posibilidades de hallar un hospedante. En caso de no encontrarlo se limita su crecimiento en un periodo de 20 a 30 días; después de este periodo, pueden ocurrir varias modificaciones en su morfología como la retracción del citoplasma de los ápices, la producción de septos y el desarrollo de ramas laterales, que indican la terminación del crecimiento de la hifa (Camarena, 2012). En caso contrario las esporas reconocen las señales de la planta hospedante. La planta emite las señales mediante los exudados. Los exudados contienen diferentes tipos de compuesto y hormonas que favorecen al desarrollo de HMA, como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), esencial para la germinación de la spora y crecimiento de la hifa (Balo *et al.*, 2000). Una vez localizada la raíz de la planta hospedera se comienza la formación del apresorio, estructura por la cual las hifas penetran al interior de la raíz.

La planta por su parte al reconocer al HMA activa su respuesta de defensa mediante elicitores que conducen a una serie de cambios bioquímicos, sin embargo, está es débil, localizada y no impide la colonización del hongo (Ramírez *et al.*, 2010). Una vez que el HMA está dentro de la planta, este produce enzimas que marcan el camino de la colonización de las hifas. Cuando las hifas llegan a las células corticales se comienza la formación del arbusculo y en la planta se comienza la activación de genes que permiten una reorganización celular y el intercambio de nutrientes (Ramírez *et al.*, 2010; Camarena, 2012). Mientras tanto, el micelio externo del HMA crece en busca de agua y nutrientes minerales. El ciclo

del hongo finaliza después de la formación de esporas en el micelio externo del hongo (Requena *et al.*, 2006).

### **2.9.2 Los HMA en la absorción de nutrientes**

En la asociación formada entre planta-hongo, el hongo actúa como un complemento de la raíz de la planta. El HMA ayuda a la absorción de nutrientes como fósforo (P), nitrógeno (N), cobre (Cu), zinc (Zn) y potasio (K) (Requena *et al.*, 2006).

El fósforo es un elemento esencial para las plantas, forma parte estructural de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, enzimas y coenzimas, sin embargo, es poco móvil y aunque se encuentre en altas cantidades en el suelo es poco disponible para las plantas. Cuando las plantas carecen de fósforo, alteran varios aspectos de su funcionamiento radical para mejorar su adquisición: estimulan el crecimiento de sus raíces laterales y pelos absorbentes y permiten una mayor colonización de los HMA. En la simbiosis de planta-HMA, el HMA puede secretar fosfatasa extracelulares que hidrolizan el P inorgánico para hacerlo asimilable para la planta. También existe la presencia y activación de transportadores de P (Karandashov y Bucher, 2005).

Una mejor nutrición de la planta se ve reflejada en un mayor desarrollo y crecimiento, como se ha encontrado en varios estudios. Por ejemplo, Quiñones *et al.* (2012), observaron un crecimiento 500% mayor en plantas de papaya (*Carica papaya* L.) micorrizadas con especies de *Glomus* y con diferentes dosis de P, en condiciones de invernadero. En Chile (*Capsicum annuum* L.), Contreras *et al.* (2013), encontraron mayor crecimiento (mayor diámetro del tallo, área foliar, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz) en plantas micorrizadas con *Glomus coremioides*, *G. sinuosum*, *G. geosporum* y *Gigaspora* sp. en relación a plantas no inoculadas. Reyes *et al.* (2016), en Chile poblano en condiciones de invernadero encontraron mayor crecimiento en plantas inoculadas con un consorcio de HMA, reflejándose en mayor altura, grosor de tallo y número de hojas.

### 2.9.3 Los HMA como agentes de control biológico

La asociación micorrízica arbuscular ha demostrado conferir protección contra patógenos tanto en la raíz como la parte aérea de la planta (Pozo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Tena *et al.*, 2016; Trinidad *et al.*, 2017).

De forma directa los HMA son capaces de competir con fitopatógenos por espacio y nutrientes dentro de la raíz y la micorrizósfera (Trotta *et al.*, 1996). Los exudados producto de la simbiosis (HMA-planta) permiten el establecimiento de microorganismos antagónicos a fitopatógenos (Azcón *et al.*, 1997). De manera indirecta, la simbiosis mejora el estado nutricional de la planta, lo que le permite mayor tolerancia a diferentes factores de estrés biótico y abiótico. También, Los HMA pueden inducir mecanismos de defensa de la planta (RSI y RSA). Desde el momento de la colonización se activan las rutas metabólicas donde están involucradas fitohormonas como el ácido jasmónico y el etileno que conllevan a la síntesis de sustancias tóxicas para los fitopatógenos, como fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (Madriz, 2002).

Liu *et al.* (2007), observaron un incremento en la resistencia de plantas de *Medicago truncatula* micorrizadas con inóculos de *Gigaspora gigantea* y *Glomus versiforme* frente a *Xanthomona campestris* pv. *alfalfae*. En primera instancia la respuesta fue localizada, posteriormente sistemáticamente. En invernadero, Galindo (2008), reportó efecto bioprotector de HMA ante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mostró que las plantas micorrizadas reducen el número de las lesiones causados por la mancha bacteriana. Reyes *et al.* (2016), evaluó el efecto de promoción de crecimiento y bioprotección contra la marchitez (*Phytophthora capsici* L.) en chile serrano y chile poblano. Evaluó siete inóculos de HMA, con los que encontró un incremento en el crecimiento en las dos variedades de chile, además de una reducción de la severidad de la marchitez. Por su parte Trinidad *et al.* (2017), evaluaron en invernadero tres consorcios de HMA nativos y un inóculo comercial en la promoción de crecimiento y potencial de biocontrol ante *Fusarium oxysporum* en plantas de agave mezcalero (*Agave cupreata*), reportó un incremento significativo en el crecimiento de las plantas inoculadas con HMA

respecto al testigo (sin HMA), en lo referente al biocontrol uno de los consorcios nativos y el inoculo comercial mostraron un efecto en la disminución de la severidad de la enfermedad.

Pérez (2010), en un trabajo en invernadero aplicó HMA contra patógenos en jitomate: la cepa de *G. hoi-like* fue eficaz contra *Alternaria solani* y *Oidio psistaurica*, y *Phytophthora infestans*, reduciendo la severidad de los daños provocados por estos patógenos.

## **2.10 Mecanismos de defensa de las plantas**

La planta expresa varios mecanismos de defensa, los cuales pueden ser inducidos por organismos patógenos o por organismos no patógenos que interactúan con las plantas (Gianinazzi, 2004).

En respuesta al ataque de patógenos, la planta genera señales adaptativas produciendo compuestos que reducen o inhiben el ataque o el rendimiento de sus enemigos. Las respuestas se producen tanto en el órgano de la planta atacada originalmente y en partes distantes (García y Pérez, 2003).

Se conocen dos mecanismos de defensa; resistencia sistémica adquirida (RSA) y resistencia sistémica inducida (RSI), cuyos mecanismos de acción están regidos por el ácido salicílico, etileno y jasmonatos (Gary *et al.*, 2004).

### **2.10.1 Resistencia sistémica inducida**

La RSI se manifiesta como respuesta a la colonización del sistema radicular principalmente por rizobacterias de las plantas para promover el crecimiento y la protección contra patógenos. Esta respuesta es un estado fisiológico de la capacidad defensiva de la planta mejorada por estímulos ambientales contra una amplia gama de patógenos y parásitos (Gary *et al.*, 2004). Se caracteriza por la acumulación de etileno y jasmonatos que promueven la síntesis proteínas y metabolitos secundarios que ayudan a la planta a protegerse de patógenos (Ramírez y Rodríguez, 2012).

La resistencia sistémica inducida puede traducirse para varias respuestas, tales como un estallido oxidativo que conduce a la muerte celular e impide al invasor el

acceso a nutrientes y agua, o cambios en la composición de la pared celular que pueden inhibir la penetración por el patógeno. Estas respuestas pueden extenderse a todas las partes de la planta (Heil y Bostock, 2002).

### **2.10.2 Resistencia sistemática adquirida**

La RSA se caracteriza por la activación de mecanismos de defensa en respuesta a los patógenos que se origina en el punto de infección e involucra una repuesta de hipersensibilidad. Esto ocurre cuando existe un reconocimiento gen a gen del patosistema planta-patógeno: a partir de este momento se inicia la respuesta de la planta con el aumento en la expresión de genes relacionados con la defensa de planta. Esta expresión de genes está regulada principalmente por ácido salicílico (Díaz, 2013).

Como primera respuesta de defensa están las barreras físicas como el engrosamiento de la pared celular mediante la producción de lignina o la formación de callo. Posteriormente se sintetizan fitoalexinas relacionadas al patógeno y la muerte de las células cercanas al patógeno (Schneider *et al.*, 1996).

### III. JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia a nivel *in vitro* y en invernadero donde se muestra el potencial biológico tanto de cepas de HMA como de bacteriófagos en el control de enfermedades en plantas. Sin embargo, hasta la fecha no existen trabajos donde evalúen el efecto combinado de ambos microorganismos sobre el control de enfermedades bacterianas; por lo que en esta investigación se planteó evaluar el efecto de hongos micorrízicos arbusculares, bacteriófagos y su combinación ante el daño causado por *Xanthomonas campetris* pv. *vesicatoria* en plantas de Chile “Chilaca” en condiciones de invernadero.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La combinación de hongos micorrízicos arbusculares y bacteriófagos reducirá al daño ocasionado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, en plantas de chile y además se promoverá el crecimiento y desarrollo de la planta.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de hongos micorrízicos arbusculares, bacteriófagos y su combinación ante el daño causado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile “chilaca” en invernadero.

### 5.2 Objetivos específicos

- Comparar el crecimiento y desarrollo de las plantas de chile con diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares y sin el uso de estos.
- Evaluar el efecto bioprotector de HMA en el control de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile.
- Evaluar el efecto del bacteriófago en el control de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile.
- Evaluar la interacción de HMA- bacteriófagos- planta en el control de la mancha bacteriana en plantas de chile.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Pruebas de patogenicidad de la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile “Chilaca”

#### 6.1.1 Resumen

Con el objetivo de determinar el método más eficiente para la inoculación de la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile variedad chilaca, se realizó un experimento en condiciones controladas (temperatura 25°C, humedad ambiental 90% y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad), donde se evaluaron cinco técnicas diferentes: aspersión has, aspersión envés, aspersión haz-envés, herida y microabrasión, dos fases de crecimiento de la bacteria: estacionario y logarítmica a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, sobre el desarrollo de la enfermedad. Una vez manifestados los síntomas se verificó la presencia de la bacteriana en tejidos enfermos mediante los postulados de Koch, se realizó una comparación morfológica y posteriormente una comparación molecular mediante PCR. A los 21 días después de la inoculación se evaluó la defoliación de las plantas y las hojas que presentaron manchas. Se encontró que las técnicas de aspersión haz-envés resultó ser la más eficiente Tukey ( $P \leq 0.05$ ), para la infección de la enfermedad. Se corroboró tanto morfológicamente como molecularmente la presencia de la cepa BV801 de *X. campestris* pv. *vesicatoria* en tejidos enfermos. Respecto a las fases de crecimiento bacteriano evaluadas no hubo efecto en la efectividad de inoculación. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método más efectivo para enfermar a las plantas de chile fue la inoculación aspersión haz- envés en una fase de crecimiento estacionario de la bacteria.

### **6.1.2 Introducción**

La mancha bacteriana causada por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), afecta el rendimiento del cultivo del chile y la calidad de los frutos. La mancha bacteriana es una enfermedad que afecta tallos, peciolos, hojas y frutos de la planta de chile; se caracteriza por la aparición de pequeñas manchas color amarillo que con el progreso de la enfermedad se tornan color marrón o negro y provoca defoliación severa de la planta (Shultz y French, 2011; Hernández, 2012).

Las condiciones idóneas para la proliferación de Xcv son temperaturas altas de 25 a 30°C y ambientes húmedos con humedad relativa >60%. La bacteria penetra en la planta a través de aberturas naturales (estomas, hidátodos, etc.) y/o heridas provocadas en el tejido vegetal (Carrillo *et al.*, 2001).

Para llevar a cabo experimentos del control de cualquier enfermedad es de vital importancia realizar pruebas preliminares para la selección del método más eficiente para realizar la inoculación del patógeno. Para la inoculación de Xcv se han utilizado diferentes técnicas como lo son: infiltración, aspersion o heridas (Galindo, 2008; López, 2016). También es importante considerar que la eficiencia de la inoculación depende de factores de la planta (variedad, etapa fenológica, nutrición y manejo después de la inoculación) y del patógeno (concentración y edad del inóculo) (Cruz *et al.*, 2001). Por lo que se realizó un ensayo de patogenicidad el cual tuvo como objetivo determinar el método de infección más eficiente para enfermar las plantas de chile “Chilaca”, así como determinar la fase de crecimiento de la bacteria (fase exponencial o logarítmica) en el medio nutritivo del que se tomó para ajustar la concentración de la solución a inocular.

### **6.1.3 Metodología**

#### **Condiciones ambientales**

La prueba de patogenicidad se realizó en condiciones controladas en cámara de incubación en el laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología

Vegetal del CIATEJ con condiciones controladas de temperatura a 25°C, humedad ambiental alta (90%) y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

### **Material biológico**

Se utilizaron semillas criollas de chile variedad pasilla, originarias del municipio de Queréndaro, Michoacán, cosecha 2016.

La cepa *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* utilizada fue BV801 aislada en el 2015 en Mascota, Jalisco (López, 2016) y proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ. Su cultivo se realizó en medio nutritivo de extracto de levadura-agar-peptona-glicerol (NYGA) (Anexo 1).

### **Germinación de las semillas de chile**

Las semillas de chile “chilaca”, se lavaron con agua destilada para quitar impurezas y se desinfectaron con etanol al 3% en agitación por tres minutos, posteriormente en hipoclorito de sodio al 3% y se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Las semillas se sembraron en charolas plásticas con sustrato suelo, arena y agrolita (6:3:1 v/v) previamente esterilizado en autoclave (120°C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 6 h). Las charolas se dejaron en invernadero, se regaron con agua corriente cada tercer día para mantener la humedad a capacidad de campo.

### **Trasplante de plántulas de chile**

El trasplante de las plántulas se efectuó 37 días después de la siembra, se realizó a bolsas plásticas de polietileno negras con 1.7 kg de sustrato. El sustrato que se utilizó consistió en una mezcla de suelo, arena y perlita en una proporción (6:3:1 v/v). Esta mezcla de sustrato fue esterilizada en autoclave a 120°C por 6 horas a una presión de 1.05 kg cm<sup>-2</sup>.

### **Preparación del inóculo de la cepa BV801 de Xcv**

Se inoculó la cepa BV801 de Xcv en medio líquido NYG (Anexo 3), se dejó en agitación una noche para su crecimiento. Al día siguiente, se tomaron lecturas de

la concentración bacteriana en un espectrofotómetro. Para obtener el inóculo en fase de crecimiento estacionaria, se tomó una alícuota y se diluyó para ajustar su concentración a  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) en un volumen final 20 mL. Para obtener el inóculo de bacteria en fase de crecimiento exponencial, se preparó otro matraz con 500  $\mu\text{L}$  del cultivo de la bacteria en fase estacionaria en 20 mL de medio NYG. Después de 6 horas, se tomó una alícuota que se ajustó a la misma concentración ( $1 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ ). Se realizó el lavado de las dos soluciones/inóculo de bacteria para eliminar impurezas; dos veces con agua estéril y se centrifugó de 15 min a 13000 repeticiones por minuto (rpm) y se dejaron suspendidas en 20 mL de buffer de fosfatos (Anexo 4).

### Diseño experimental

Como factores se evaluaron cinco técnicas diferentes de inoculación y tomando el medio con crecimiento en dos fases de crecimiento (estacionaria y logarítmica) (Cuadro 1). La solución se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ .

Cuadro 1. Diseño de tratamientos evaluado la eficiencia de diferentes técnicas de inoculación y la fase de crecimiento bacteriano en el medio de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, en plantas de chile “Chilaca”.

Factor fase de crecimiento	Factor técnica de inoculación	Tratamiento	Clave
<b>Fase estacionaria</b>	Aspersión por haz	1	Est.1
	Aspersión por envés	2	Est.2
	Aspersión por haz y envés	3	Est.3
	Heridas	4	Est.4
	Microabrasión con carburo de sílice	5	Est.5
<b>Fase</b>	Aspersión por haz	6	Exp.1

<b>exponencial</b>	Aspersión por envés	7	Exp.2
	Aspersión por haz y envés	8	Exp.3
	Heridas	9	Exp.4
	Microabrasión con carburo de sílice	10	Exp.5

Se repitió tres veces cada tratamiento, para un total de 30 unidades experimentales. La unidad experimental fue una planta de 62 días de crecimiento en una bolsa de polietileno color negra, con 1.7 kg de sustrato.

#### **Inoculación de la cepa BV801 de Xcv en plantas de chile “Chilaca”**

La inoculación se realizó en la tercera hoja de las plantas, contando de arriba hacia abajo, a los 37 días después del trasplante. La inoculación por aspersión se realizó con un atomizador previamente calibrado y se aplicó 1 mL de la solución bacteriana para las técnicas por aspersión de un solo lado de la hoja (haz o envés) y 2 mL en aspersión haz-envés (Fig. 2). La técnica de micro-abrasión se realizó con carburo de sílice; en una espátula se le colocó en la punta cinta adhesiva y se metió al carburo de sílice, con el carburo adherido se raspó la hoja de la planta para provocar pequeñas heridas. La técnica por herida, fue hecha con un bisturí, haciendo un corte de 1 cm en la cutícula de la hoja. En ambas técnicas se les aplicó con micro-pipeta 50 µL de la solución bacteriana.

Las plantas inoculadas fueron colocadas en cajas plásticas, en el fondo de las cuales se colocó papel absorbente humedecido con agua destilada estéril para mantener una humedad elevada y favorecer la inoculación. Las cajas se colocaron en un cuarto de crecimiento a temperatura constante de 25°C y fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad).



Figura 2. Detalle de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv por la técnica de aspersión: (a) aspersión por el envés; (b) aspersión por el haz).

Una vez que los síntomas se manifestaron, se verificó que estos fueran efecto de la cepa BV801 de Xcv, para lo cual se siguieron los criterios de Robert Koch: La bacteria debe aislarse en cultivo puro siempre de individuos enfermos y nunca de sanos, si la bacteria se inocula a otro individuo debe reproducirse la enfermedad y la bacteria debe aislarse nuevamente en cultivo puro para su comparación con la bacteria inicialmente inoculada.

Los aislamientos se tomaron de cinco hojas que presentaron síntomas de la enfermedad. Las hojas se maceraron en morteros estériles, el macerado se sembró en medio nutritivo NYGA, se dejó crecer dos días. El crecimiento bacteriano de los aislados se observó y comparó con las características morfológicas de la cepa BV801 control.

### **Comprobación de los Postulados de Koch mediante técnicas moleculares**

Para corroborar la identidad de la cepa BV801 de Xcv de los aislados recuperados, se realizó la ampliación del fragmento intergénicoribosomal 16S-23S (ITS) utilizando los oligonucleótidos G1 (GAAGTCGTAACAAGG) y L1 (CAAGGCATCCACCGT). Este fragmento es característico de bacterias y tiene

variabilidad en su longitud de acuerdo con el género y especie de la bacteria (Jensen *et al.*, 1993).

A partir de 1 mL en medio nutritivo de los aislados de las plantas de Chile enfermas y de la cepa BV801 (inoculo inicial) se llevó a cabo la extracción de ADN con el kit de extracción promega (Anexo 11) y posteriormente se amplificó el fragmento ITS por la técnica molecular de reacción en cadena de polimerasa (PCR). El resultado de la PCR se corrió en gel de agarosa 0.8 por electroforesis y se visualizó mediante bromuro de etidio (BrEt) y luz UV en una cámara fotográfica.

### **Variables de respuesta evaluadas y análisis estadísticos**

Se evaluó la presencia o ausencia de la enfermedad, número de hojas con manchas, defoliación de la planta. Estas variables se evaluaron 21 días después de la inoculación de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Para seleccionar el método de infección más eficiente para infectar a las plantas, se realizó un análisis estadístico ANOVA (95% de confianza) y la comparación de medias Tukey de las variables porcentaje de defoliación y porcentaje de las hojas que presentaron síntomas provocados por la cepa BV801 de Xcv. Previo al análisis, los datos fueron transformados con la función  $\sqrt{n+\frac{1}{2}}$  para cumplir con la normalidad y homogeneidad de varianzas.

#### **6.1.4 Resultados**

##### **Sintomatología de la mancha bacteriana en plantas de Chile “Chilaca”**

Las plantas inoculadas por las técnicas por aspersión presentaron los siguientes síntomas: a los 7 días después de la infección (ddi) (Fig. 3), en la parte apical, se observó a las hojas traslúcidas, producto de la maceración interna, lo que reflejaba que la parte interna de la hoja estaba desecha. En los días siguientes este síntoma se presentó en hojas maduras y también aparecieron manchas cloróticas. Para los días 9 y 10 ddi casi todas las hojas presentaban síntomas de la enfermedad. Las hojas más jóvenes, se necrosaron, hojas con manchas amarillas y defoliación en general. En días siguientes las manchas tomaron una coloración

marrón y se presentó necrosis, para el día 13 algunas plantas presentaban un 80% de defoliación.



Figura 3. Desarrollo de la mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) en chile chilaca a través del tiempo. Los recuadros señalan el día después de la inoculación en el que presentó el síntoma.

Por otra parte, las plantas inoculadas por las técnicas de herida y microabrasión presentaron solo los primeros síntomas (parte apical de las hojas traslucidas) al día 11 y no se desarrolló más la enfermedad (Fig. 4).



Figura 4. Aspecto de planta inoculada con la técnica de microabrasión 21 días después de la infección. La flecha indica la hoja en la que se realizó la inoculación.

En este trabajo se observaron síntomas de la maceración interna y enrollamiento de las hojas de la parte apical de la planta, que es un síntoma que no se ha

reportado en trabajos previos sobre la mancha bacteriana en plantas de Chile (Galindo, 2008; Shultz y French, 2011; Hernández, 2012; López, 2016). Vidaver *et al.* (2004), mencionan que los síntomas de una enfermedad bacteriana pueden variar por diversos factores, entre los que se encuentra la humedad. La humedad en este ensayo se mantuvo cercana al 100% de manera constante, de manera natural es difícil mantenerla por largos periodos de tiempo. Solo hay una mención que durante periodos de abundante humedad (lluvias fuertes, neblina o rocío), los síntomas de la mancha bacteriana las hojas tendrán una apariencia marchita en vez de las típicas manchas en las hojas (Seminis, 2018).

### **Análisis estadístico de las variables respuesta**

De acuerdo al análisis de varianza (Cuadro 2) la fase de crecimiento de la bacteria no tuvo efecto significativo, sobre el número de hojas con manchas ni sobre el grado de defoliación. La técnica de inoculación utilizada tuvo efecto significativo sobre la defoliación de la planta y en la proporción de hojas con manchas ( $P \leq 0.05$ ). Por último, la variable hojas con daño, mostró una interacción entre la técnica utilizada para la inoculación y la fase de crecimiento utilizada para la preparación de la solución aplicada.

Cuadro 2. Efecto de la técnica de inoculación, la fase de crecimiento de la cepa BV801 y su interacción en defoliación y hojas con manchas”, a los 21 días después de la inoculación con la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

<b>Factor</b>	<b>Defoliación</b>	<b>Hojas con manchas</b>
<b>Técnica de inoculación</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
<b>Aspersión haz</b>	50.97±5.00b	24.48±5.88 a
<b>Aspersión envés</b>	50.73±5.26b	33.155±5.20 a
<b>Aspersión haz-envés</b>	70.05±5.34a	28.2817±5.59 a
<b>Herida</b>	0.0±0.0c	32.6±2.601 a
<b>Microabrasión</b>	0.0±0.0c	26.85±6.24 a
<b>Fase de crecimiento</b>		
<b>Fase estacionaria</b>	33.56±8.27 a	26.7527±3.78 a
<b>Fase exponencial</b>	35.13±7.905 a	31.396±2.521 a
<b>Interacción técnica/fase</b>	<i>P</i> = 0.0954	<i>P</i> = 0.046

De acuerdo a la comparación de medias la técnica de inoculación aspersion haz-envés fue la más eficiente para la infección de las plantas con Xcv de acuerdo a la defoliación provocada en la planta. Las técnicas que resultaron menos eficientes para infectar fueron la herida y la microabrasión, que no provocaron defoliación en las plantas inoculadas (Fig. 5).

De la técnica aspersion haz-envés en fase de crecimiento estacionaria fue el tratamiento que presentó mayor defoliación. En la práctica, de acuerdo al tiempo y proceso que implica la preparación del inóculo, es más fácil preparar el inóculo a partir de medio con bacterias en fase estacionaria.

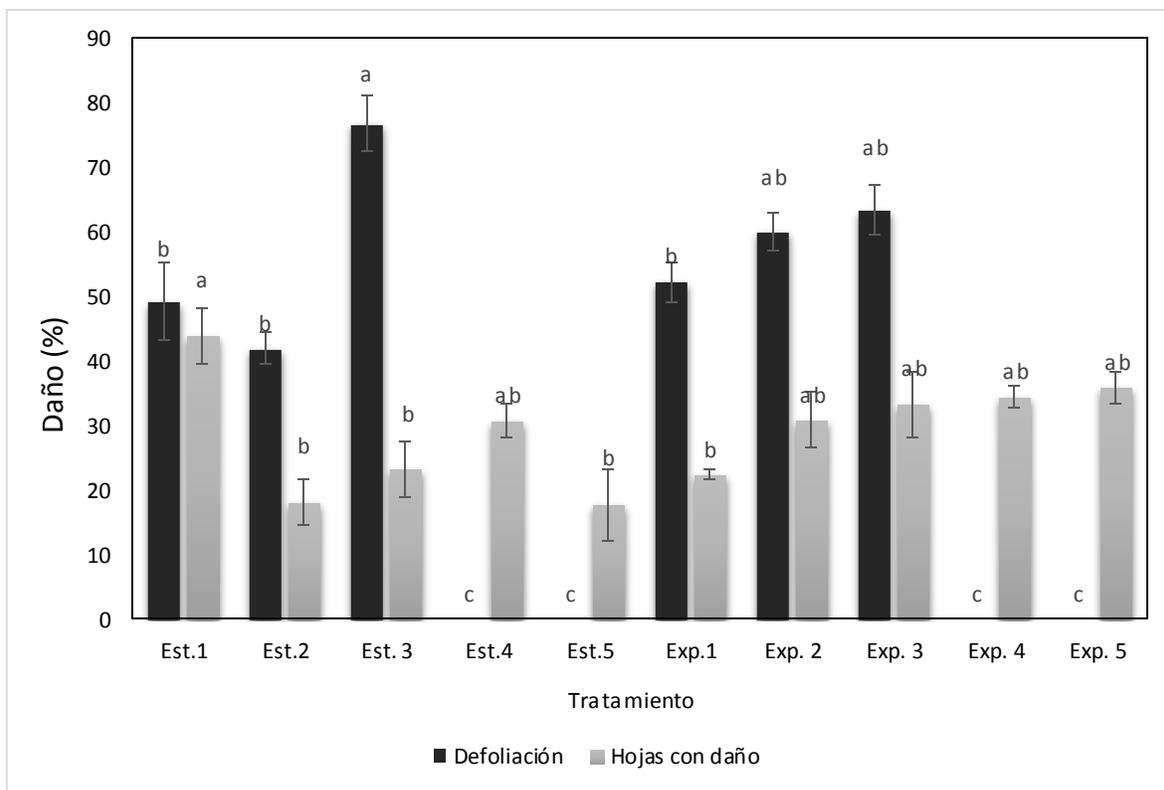


Figura 5. Efecto del método de inoculación de la cepa BV801 de Xcv, en defoliación y número de hojas que presentaron daño de la mancha bacteriana, en plantas de chile “chilaca” en condiciones controladas con temperatura a 25°C y humedad relativa del 90%. Fase bacteriana: estacionaria (Est); exponencial (Exp), Técnica de inoculación; (1) aspersion haz, (2) envés, (3) haz-envés; (4) microheridas y (5) herida. Las barras en rectángulos indican el error estándar. Letras distintas por columna indican diferencias significativas según Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

La técnica de inoculación por aspersion ha sido empleada con éxito para inocular *Xanthomonas* sp. (Balogh *et al.*, 2003; 2018), Jones *at al.* (2007) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*), Pernezny y Collins (1997), López (2016) y Gasic *et al.* (2018), en plantas de chile. Esta técnica de inoculación permite la entrada de la bacteria a la planta por estomas e hidátodos aberturas naturales de las plantas, por lo que la bacteria entra a la planta sin provocar otras alteraciones en el sistema de la planta. Caso contrario pasa al provocar heridas en la epidermis de la hoja, lo que induce la transcripción de genes relacionados con la reparación

celular (Zavala, 2010), dicho proceso podría inhibir o afectar la propagación de Xcv en tejidos de la plantas y por lo tanto se explica la ineficiencia de las técnicas de inoculación por herida y microabrasión. Galindo y Gonzáles (2008; 2012) utilizan la técnica por heridas para infectar plantas de tomate con Xcv: para lograr la inoculación hacen raspado en haz- envés de cada foliolo y las sumergen en la suspensión bacteriana. Esta técnica, provoca estrés en la planta (lo que puede inhibir la propagación de Xcv), además de no haber sido exitosa en nuestro experimento, es más compleja de implementar de implementar.

### Comprobación de los postulados de Koch

De los cinco aislados cuatro presentaron la consistencia mucóide y una coloración amarilla característicos de la cepa BV801 de Xcv (Fig 6).

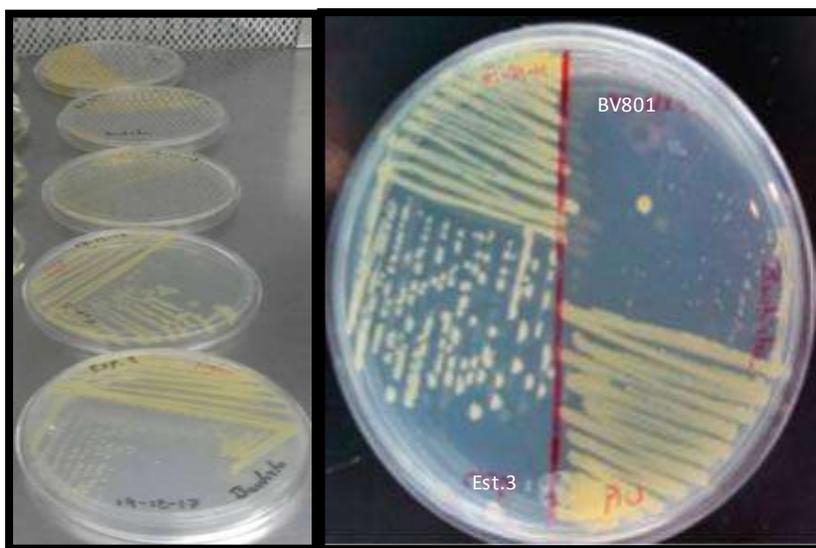


Figura 6. Características morfológicas de las cepas recuperadas de tejidos enfermos de diferentes tratamientos y la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (BV801); Tratamiento de aspersión haz-envés en fase de crecimiento estacionaria (Est. 3).

### Comprobación de los postulados de Koch moleculares

En la fig. 7, se muestra la visualización de la ampliación del fragmento intergénico ribosomal 16S-23S (ITS) de la cepa BV801 y las cepas recuperadas de tejidos

enfermos de diferentes tratamientos (exp.3, est. 3, exp.2 y est.1). De acuerdo al marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) se observa que la longitud de los fragmentos amplificados se encuentra entre las 500 y 600 pares de bases (pb), lo cual se encuentra dentro del rango típico de especies de *Xanthomonas* (López *et al.*, 2016). Por lo que se considera que las cepas aisladas de tejidos enfermos corresponden a la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* que se inoculó.

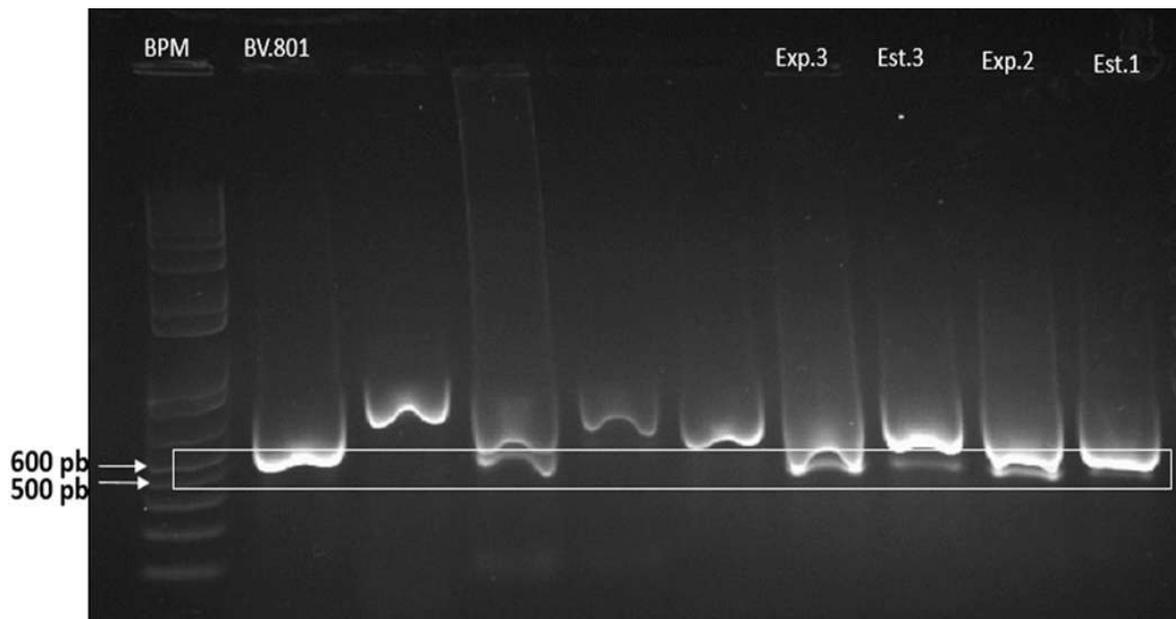


Figura 7. Comparación molecular de la longitud del fragmento intergénico ribosomal 16S-23S (ITS) amplificado de la cepa BV801 de *Xcv* y las bacterias aisladas de tejidos enfermos. Marcador molecular 1 Kb DNA ladder (Invitrogen) (BMP), BV.801 cepa BV801, técnica de aspersión haz- envés en fase bacteriana exponencial (Exp.3), técnica de aspersión haz- envés en fase bacteriana estacionaria (Est.3), técnica de aspersión envés en fase de crecimiento exponencial (exp.2), técnica de aspersión haz en fase de crecimiento estacionaria (est.1).

### 6.1.5 Conclusiones

La técnica de aspersión haz-envés fue la más eficiente para la inoculación de Xcv en plantas de chile Chilaca para provocar los síntomas típicos de la mancha bacteriana. Y la eficiencia de la inoculación no se vio afectada por la fase de crecimiento bacteriano del que se tomó para preparar el inóculo.

Se observaron síntomas de la mancha bacteriana en plantas de chile “chilaca” que anteriormente no han sido reportados en plantas de chile. De las plantas que presentaron los síntomas se tomaron muestras y se corroboró que la manifestación de la enfermedad fue consecuencia de la inoculación de la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* mediante comparación morfológica y molecular de las cepas aisladas y la cepa control BV801.

### 6.1.6 Bibliografía

- Balogh, B; Jones, J; Momol, M; Olson, S; Obradovic, A; King, P; and Jackson, L. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*. 87:949-954
- Cruz, S; Ramírez, R; Tlapal, B; Ramírez, I; García, R; Sandoval J y Castillo, F. (2001) producción masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. *Agrociencia* 35(5): 575-581.
- Galindo, F. (2008). Resistencia inducida por micorrizas en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) ante *Xanthomonas Campestris* ps. *Vesicatoria*. Tesis de Maestría Instituto Politécnico nacional, México.
- Gasic K; Kuzmanovi, N; Ivanovi N, Proki, D; Sevi, M; y Obradovic, A. (2018). Complete Genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* Specific Bacteriophage KΦ1, Its Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Frontier in microbiology*. 9:1-12.
- Hernández, H. (2012). Ficha técnica mancha bacteriana del tomate; bacterial leaf spot. Edo. Méx., Méx. Universidad autónoma Chapingo.
- Jensen M; Webster J y Straus N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction–amplifier ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (4); 945–952.

- López, C; Solís, A; Quiñones, E; Qui, J; Rincón, G. (2016). Aislamiento del agente causal de la mancha bacteriana de Chile en las regiones productoras de Jalisco, Zacatecas y Michoacán. *Biotecnología y sustentabilidad*. 141-144
- Pernezny, K y Collins, J. (1997). Epiphytic Populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on Pepper: Relationships to Host-Plant Resistance and Exposure to Copper Sprays. *Plant Disease*. 81(7):791-794
- Seminis. (2018). La mancha bacteriana. Seminis. Recuperado en <http://www.seminis.mx/recursos/guia-de-enfermedades/tomates/root-knot-2/>
- Shultz, D y French R. (2011). Mancha Bacteriana del Tomate y el Pimiento. *Plant Pathology and microbiology*.
- Valencia B; Mendoza O; Silva R; Córdova T; Espinosa V, Valadez M, y Villaseñor M. (2007). Indicadores de agresividad y métodos de inoculación con bacterias fitopatógenas en plántulas y semillas de trigo 'seri m82'. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3), 255-259.
- Vidaver, A; y Lambrecht, P. (2004). Las Bacterias como Patógenos Vegetales. *Trans. Ana María Romero. The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0601-01
- Zavala, J. (2010). Respuesta inmunológica de las plantas frente al ataque de insectos. *Ciencia Hoy*. 20:53-58

## **6.2 Generación de una escala para cuantificar el daño de la mancha bacteriana en chile “chilaca”**

### **6.2.1 Resumen**

Con la finalidad de evaluar el daño ocasionado por la bacteria patógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv), en plantas de chile, se realizó un ensayo para generar una escala cualitativa ordinal de daño. Para esto, plantas de chile ancho variedad San Luis y plantas de chile criollo chilaca con 60 días de crecimiento, se inocularon con una suspensión de 1.8 mL de Xcv a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC. Después de infectadas las plantas fueron colocadas en diferentes condiciones de temperatura y humedad para favorecer la infección. Se evaluó el tiempo en que manifestaron los síntomas y el desarrollo de la enfermedad. Se tomaron muestras de tejidos enfermos para la comprobación de los postulados de Koch. Se encontró que todas las plantas infectadas presentaron síntomas de la enfermedad, el tiempo de aparición de síntomas varió de acuerdo a las condiciones de temperatura y humedad, las dos variedades presentaron síntomas similares. Las manchas en las hojas se presentaron de diferentes tamaño y aspecto en las diferentes condiciones a las que fueron sometidas. La comparación morfológica de las cepas aisladas corroboró la presencia la bacteria en tejidos enfermos de la planta. Finalmente se generaron dos escalas cualitativas de daño, la primera elaborada en condiciones de temperaturas de 25 a 30 °C y una humedad relativa del 90% con seis niveles y la segunda con cuatro niveles con temperaturas de 17.6 a 47.9°C y una humedad relativa de 34 a 90%.

### **6.2.2 Introducción**

La principal razón para medir las enfermedades en plantas es la de obtener datos de la presencia y desarrollo de este tipo de problemas fitosanitarios, es una forma de medir la intensidad y prevalencia de una enfermedad (Salazar, 2014). Se requieren métodos estandarizados de cuantificación visual de los daños ocasionados por la enfermedad, que provea de resultados fácilmente reproducibles entre investigadores o instituciones, esto con la finalidad de facilitar la realización de estudios de investigación que permitan evaluar posibles

estrategias de manejo de las enfermedades (Ramos *et al.*, 2015). Al igual que con la mayoría de las enfermedades de las manchas foliares, la severidad de la mancha bacteriana se puede cuantificar contando el número de lesiones o manchas por hoja, o defoliación (Bardsley y Ngugi, 2012). Sin embargo, las lesiones de la mancha bacteriana a menudo se unen, presentan diferentes tamaños y su coloración va de marrón, grisáceas o negras, las hojas pueden presentar clorosis, se pueden presentar lesiones angulares en la punta de la hoja, costilla media, y / o a lo largo del margen de la hoja y la defoliación puede o no estar presentes (Ritchie, 1995; Galindo 2008), lo que dificulta el recuento de lesiones y es propenso a errores durante la estimación visual, lo que complica la estimación de la gravedad de la enfermedad. La variación en la expresión de la mancha bacteriana va a depender del cultivar, del patógeno y las condiciones ambientales (Vidaver, 2004). En el caso de la mancha bacteriana en Chile no hay documentada una escala de daños de la virulencia de la bacteria. Por lo que se llevaron a cabo experimentos con la finalidad de elaborar una escala de daño cualitativa de la mancha bacteriana en Chile en diferentes condiciones de humedad y temperatura con el objetivo de estandarizar una escala de daño de la enfermedad en plantas de Chile para próximos estudios.

### **6. 2. 3 Metodología**

El primer ensayo se realizó en condiciones controladas de temperatura a 25°C, humedad ambiental alta (90%) y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad en cámara de incubación de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ.

El segundo ensayo se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (19°42' longitud norte, 101°09'03.13 latitud oeste, 1941 msnm). Este ensayo se desarrolló en los meses de junio y julio, bajo cuatro condiciones de temperatura (T°) y humedad relativa (HR) diferentes, dos de ellas en laboratorio y las otras en invernadero.

## **Material biológico**

El material vegetal utilizado fueron plantas de chile ancho de la variedad San Luis y chile chilaca variedad criolla pasilla.

La cepa bacteriana BV801 de Xcv, proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ.

## **Germinación de semillas de chile**

Las semillas de chile “chilaca” se lavaron con agua destilada para quitar impurezas y se desinfectaron con etanol al 3% en agitación por tres minutos, posteriormente en hipoclorito de sodio al 3% y se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar.

Las semillas se sembraron en charolas plásticas con sustrato (arena, suelo y perlita relación 5:4:1 v/v) esterilizado en autoclave (190°C por 24 h.). Las charolas se dejaron en invernadero, se regaron con agua corriente cada tercer día para mantener la humedad a capacidad de campo.

## **Trasplante de las plántulas de chile**

El trasplante de chile se efectuó 35 días después de la siembra, se realizó a macetas con 600 g de sustrato. El sustrato que se utilizó como soporte para el crecimiento de las plantas de chile, consistió en una mezcla de arena, suelo y perlita en una proporción (5:4:1 v/v). Esta mezcla de sustrato fue esterilizada.

## **Preparación del inóculo de la cepa BV801 de Xcv**

Se inoculó la cepa BV801 de Xcv en medio líquido NYG, se dejó en crecimiento una noche en agitación, se tomaron lecturas de la concentración bacteriana en un espectrofotómetro y se ajustó a una concentración a  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mL ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) en un volumen final 200 mL para la inoculación. Se realizó el lavado de la solución/inóculo de la bacteria para eliminar impurezas; dos veces con agua estéril y en centrifugación de 15 min a 5000 repeticiones por minuto (rpm) y se dejaron suspendidas en buffer de fosfatos.

## **Inoculación de la cepa BV801 de Xcv en las plantas de chile**

Las plantas se inocularon a las 5 de tarde por aspersión haz-enves en la tercera hoja bien formada contando de arriba hacia abajo, con una suspensión de la cepa BV801 de Xcv ajustada a  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> a razón de 1.8 mL por planta. Las plantas que no se inocularon con Xcv, se asperjaron con agua destilada esteril. Una vez inoculadas las plantas se colocaron en las cajas plasticas, en la misma caja se colocaron las plantas inoculadas con Xcv y las plantas en las que solo se aplicó agua.

## **Verificación de la presencia de Xcv en tejidos de plantas enfermas de chile**

Una vez manifestados los síntomas de la mancha bacteriana se verificaron los postulados de Robert Koch para comprobar que los síntomas fueron efecto de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv. Para esto solo se tomaron muestras de plantas enfermas, una muestra por cada condición evaluada.

## **Diseño Experimental**

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres factores: 1) Condiciones de infección (en invernadero, en invernadero con humedad relativa alta, en laboratorio y en laboratorio con humedad relativa alta), 2) variedades de chile: San Luis y Chilaca. 3) Inoculo bacteriano: con y sin la aplicación de la cepa BV801 de Xcv.

Cuadro 3. Diseño de tratamientos en los que se evaluó la inoculación de Xcv en variedades de chile bajo diferentes condiciones ambientales para generar una escala ordinaria cualitativa de daño en chile.

<b>Factor variedad de chile</b>	<b>Factor condición de infección</b>	<b>Factor cepa BV801 de Xcv</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Clave</b>
<b>Chile "Chilaca"</b>	Invernadero	Con Xcv	1	ChISX
		Sin Xcv	2	ChIS
	Invernadero	Con Xcv	3	ChISX

	con humedad	Sin Xcv	4	ChIHX
	Laboratorio	Con Xcv	5	ChLSX
		Sin Xcv	6	ChLS
	Laboratorio con humedad	Con Xcv	7	ChLHX
		Sin Xcv	8	ChLH
<b>Chile ancho San Luis</b>	Invernadero	Con Xcv	9	SLISX
		Sin Xcv	10	SLIS
	Invernadero con humedad	Con Xcv	11	SLISX
		Sin Xcv	12	SLIHX
	Laboratorio	Con Xcv	13	SLLSX
		Sin Xcv	14	SLLS
	Laboratorio con humedad	Con Xcv	15	SLLHX
		Sin Xcv	16	SLLH

Por cada tratamiento se tuvieron 3 repeticiones. La unidad experimenta consistió en una planta de chile en una maceta con 600 g de sustrato esteril. Las variables que se evaluaron fue la presencia o ausencia de la enfermedad, el tiempo en la aparición de los síntomas, desarrollo y avance de los síntomas de la enfermedad.

A continuación se describe las cuatro condiciones del segundo ensayo en las que se dejaron las plantas (Fig. 8):

Condición LH. Las plantas de chile se dejaron en laboratorio en cajas plásticas tapadas con plástico transparente, en el fondo de la caja se colocó papel secante sanitas que fue humedecido con agua destilada esteril. La temperatura y la humedad que se registró fue de: máxima 29.7°C y 99% humedad relativa, mínima 24.6°C y 46% humedad relativa.

Condición LS. Las plantas de chile se dejaron en laboratorio en cajas plásticas sin tapar y sin humedecer el fondo de la caja, la temperatura y humedad relativa registrada fue máximas 27.1°C y 70% y mínimas 22°C y 40%.

Condición IH. Las plantas de chile se colocaron en cajas plásticas y se taparon con un plástico transparente bajo condiciones de invernadero, se colocaron sanitas en el fondo y se humedecieron con agua destilada esteril, con temperatura y humedad relativa máxima 47.9°C y 90% y mínima 17.6°C y 34%.

Condición IS. Las plantas de chile se dejaron en condiciones normales de invernadero, con temperatura y humedad relativa máxima 45°C y 40%, mínima 16.6°C y 10%.



Figura 8. Condiciones donde se colocaron las plantas de chile “chilaca” y variedad San Luis después de la inoculación de *Xanthomonas*, recuadros indican la clave de cada condición.

## 6.2.4 Resultados

### Ensayo 1.

En el primer ensayo en condiciones controladas (temperatura de 25°C, humedad relativa 90% y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad) los síntomas de la enfermedad se manifestaron a los 7 días después de la infección (ddi); en la parte apical de las plantas se observó las hojas traslucidas lo que reflejaba que la parte interna de la hoja se mostraron con maceración; en los días siguientes este síntoma se presentó en hojas maduras y también aparecieron manchas cloróticas; para los días 9 y 10 casi todas las hojas presentaban síntomas de la enfermedad, las hojas tiernas que presentaron la maceración inicialmente se necrosaron,

algunas hojas con manchas amarillas y algunas hojas comenzaron a caer; en días siguientes las manchas tomaron una coloración en algunos casos marrón y en otros negras y finalmente para el día 13 algunas plantas mostraron un 80% defoliadas (Fig. 9).



Figura 9. Desarrollo de la mancha bacteriana en chile, Chilaca a través del tiempo. Los recuadros señalan el día después de la inoculación en el que presentó el síntoma.

Con la sintomatología presentada en las condiciones controladas se generó una escala de daño (Fig. 10) considerando 6 niveles de daño de la mancha bacteriana en chile.

Escala de daño	Síntoma
<p>1.</p> 	<p>Planta de chile sana</p>
<p>2.</p> 	<p>Brotes tiernos de la parte apical de la planta pierden firmeza, las hojas se observan enrolladas y traslucidas (maceración interna).</p>

3.			Las hojas de parte media de la planta presentaron maceración y manchas cloróticas.
4.			Los síntomas están en el 90% de la hojas. Y algunas hojas de la parte apical se comienzan a caer.
5.			Las manchas de las hojas se observan necróticas y hay defoliación.
6.		La planta presenta una defoliación severa en 80%, las hojas que mantiene en la planta presentan daño.	

Figura 10. Escala ordinal cualitativa de daño en plantas de chile variedad “chilaca”; números señalan en nivel de daño.

## Ensayo 2.

Para el segundo ensayo los síntomas se manifestaron de la siguiente manera:

**En las condiciones LS** (en laboratorio con temperaturas que fluctuaron entre 22 y 27.1°C y HR entre 40 y 70%). Los síntomas se presentaron hasta el día 17, con manchas amarillas, en las hojas en la que se realizó la inoculación y uno o dos hojas cercanas (Fig. 11).



Figura 11. Daño de la mancha bacteria en hojas a los 22 días después de la inoculación de Xcv, en condiciones de laboratorio sin alta humedad. Rectángulos indican la hoja correspondiente a cada variedad de chile: variedad Chilaca (CH), variedad San Luis (SL).

**Condición IS** (invernadero con temperaturas que fluctuaron entre 16.6 y 45°C y humedad relativa entre 40% y 10%). Los síntomas en estas plantas aparecieron a los 18 ddi, los síntomas aparecieron en la hoja en la que se inoculo la Xcv. Y se presentaron abundantes manchas pequeñas cloróticas en la hoja en la que se hizo la inoculación y los 22 días la hoja se cayó. (Fig. 12).



Figura 12. Daño de la mancha bacteria en hojas a los 22 días después de la inoculación de Xcv en condiciones invernadero sin alta humedad. Rectángulos marcan la hoja correspondiente a cada variedad de chile: variedad chilaca (CH), variedad San Luis (SL).

En las dos condiciones anteriores los síntomas solo se presentaron en una o dos hojas de las plantas, y además el tiempo de aparición fue mucho, por lo cual no fue posible generar escalas cualitativas ordinales de daños bajo estas condiciones. Estos resultados señalan la importancia de las condiciones post-inoculación en la que deben mantener las plantas infectadas, al menos en las primeras 48 h (tiempo post inoculación). Las plantas inoculadas tienen que permanecer en condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas (25 a 30°C y HR <60%), para facilitar la entrada del patógeno a la planta. En algunos experimentos llevados en invernadero las plantas se cubren con bolsas plásticas y son metidas a cámaras de incubación por 48 h (Obradovic, 2005), otros únicamente las cubren con bolsas plásticas de 24 a 48 h (Galindo, 2008; Gonzáles, 2012; Balogh *et al.*, 2018).

**En condiciones LH.** Temperatura entre 24.6°C y 29.7°C, humedad relativa entre 46% y 99%, Los síntomas se presentaron al quinto día después de la inoculación (ddi) con Xcv, y se presentaron de la misma manera en las dos variedades de chile (ancho San Luis y criollo “chilaca”). En el quinto ddi las hojas de la parte apical de la planta se observaban traslucidas (maceración interna) y se observaron pequeñas manchas cloróticas, al siguiente día se observaron lesiones necróticas en donde anteriormente se observó la maceración, las manchas cloróticas crecieron en tamaño y aparecieron nuevas manchas cloróticas tanto en el centro como en el margen de las hojas de la parte media de planta, posteriormente el área de las lesiones necróticas aumentaron considerablemente, algunas hojas de la parte apical comenzaron a caer, las manchas amarillas se tornaron de marrón a negras y las machas aparecieron en las hojas de parte baja de la planta. Para el octavo ddi la planta estaba en un 70% defoliada y las hojas que permanecieron en la planta presentaban manchas (Fig. 13).

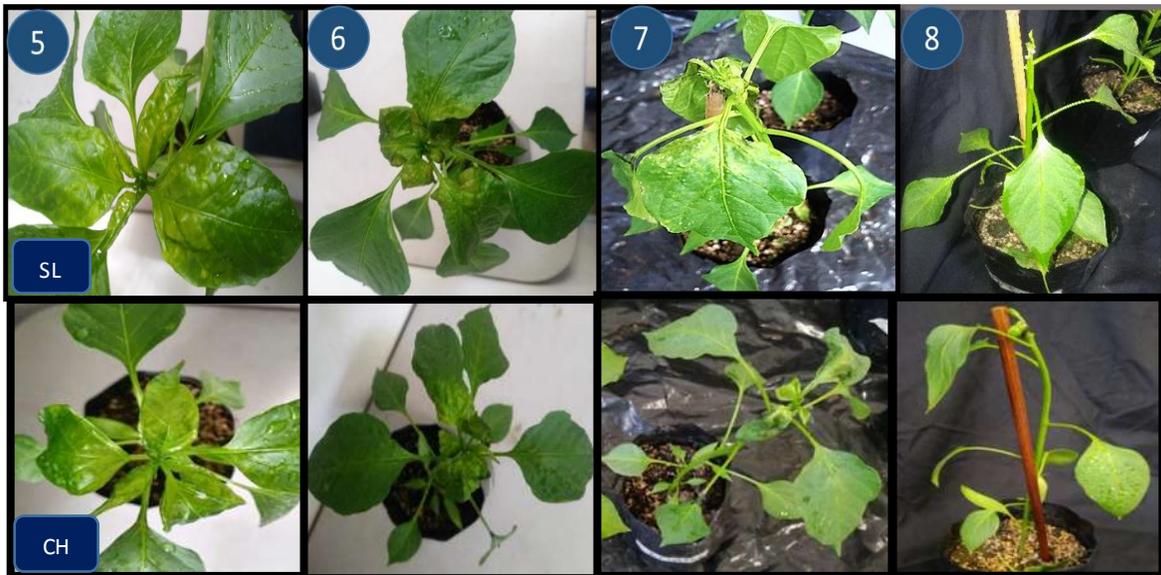


Figura 13. Desarrollo de la mancha bacteriana en chile a través del tiempo. Números en los círculos indican el día después de la inoculación en el que se manifestó el síntoma; variedad San Luis (SL); variedad “Chilaca” (CH).

Los síntomas en condiciones LH se manifestaron de manera muy similar a lo que se presentaron en condiciones controlados (ensayo 1), por lo que esto reafirma la escala cualitativa generada en el bioensayo bajo condiciones controladas (temperatura de 25°C, humedad relativa 90% y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad). Los síntomas de maceración interna y enrollamiento de las hojas de la parte apical de la planta no se ha reportado en trabajos realizados sobre la mancha bacteriana en plantas de chile (Hernández, 2012; Shultz y French, 2011; Galindo, 2008, López, 2016). Estos síntomas pueden ser el resultado de mantener las plantas a alta humedad por periodos prolongados de tiempo, lo que influye en el desarrollo de los microorganismos (Gonzales *et al.*, 2009), se facilita y acelera la proliferación de Xcv y por consiguiente la destrucción de los tejidos de las plantas.

**En condiciones IH** (con temperatura entre 17.6 y 47.9°C, humedad relativa entre 34 y 90%). Los síntomas aparecieron al décimo ddi, aparecieron pequeñas lesiones color amarillo en la hoja y hojas cercanas en la que se realizó la

inoculación, en los siguientes días (11 y 12 ddi) el número de lesiones aumentó y el tamaño de las manchas creció, al catorceavo ddi el aspecto de las manchas se tornaron color marrón. Al 16<sup>avo</sup> ddi todas las manchas se observaron con coloración marrón, en algunas hojas las manchas se juntaron y le dieron un aspecto de seco a casi toda la hoja (Fig.14).

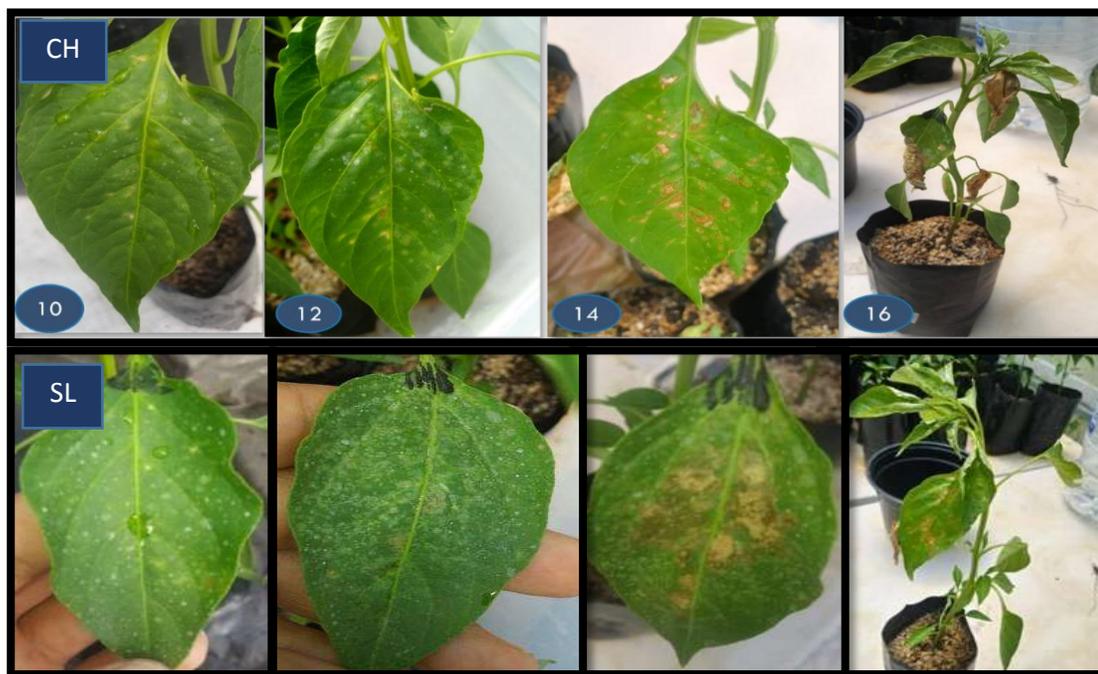


Figura 14. Daño de la mancha bacteriana en hojas de los 10 a 16 días después de la inoculación, en chiles de las variedades; variedad Chilaca (CH) y San Luis (SL). Los óvalos indican los días después de la inoculación en el que se presentó el daño.

En estas condiciones se generó una escala ordinaria de daño de cuatro niveles (Fig. 15). En el que el nivel uno fue planta sana, nivel dos aparición de manchas cloróticas en la hoja en la hoja en la que se realizó la inoculación y hojas cercanas (entre cinco y seis hojas), nivel 3 las manchas se tornan color marrón y su área comienza a aumentar. Nivel 4 en dos o tres de las hojas de las plantas las manchas han cubierto casi la totalidad de algunas hojas.

Escala de daño	Síntoma
<p>1.</p> 	<p>Planta de chile sana</p>
<p>2.</p> 	<p>Del 50 al 60 % hojas tienen pequeñas manchas cloróticas. En la hoja que se inoculó y hojas cercanas.</p>
<p>3.</p> 	<p>Las manchas presentan coloración marrón y su tamaño es mayor.</p>
<p>4.</p> 	<p>En el 20 al 30% de las hojas, las manchas marrones cubren casi en su totalidad la hoja.</p>

Figura 15. Escala ordinal cualitativa de daño en plantas de Chile variedad Chilaca; números señalan en nivel de daño.

Los síntomas se presentaron de manera diferente en casi todas las condiciones en las que se inoculó BV801 Xcv, Vidaver *et al.* (2004) mencionan que los síntomas de una enfermedad bacteriana pueden variar por diversos factores, entre los que se encuentra la humedad y temperatura. Para implementar una estrategia de control de la enfermedad es necesario conocer la etiología de esta, y conocer el comportamiento del patosistema planta-bacteria bajo diferentes condiciones (Achicanog, 2001), porque de esto dependerá la implementación de un control racional, eficaz y seguro a costos mínimos.

### **Presencia de la cepa BV801 de Xcv en los tejidos enfermos de plantas de Chile de las variedades ancho San Luis y criollo Chilaca**

Para comprobar que los síntomas manifestados fueron efecto de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv, se siguieron los postulados de Koch, tomando una hoja enferma de cada uno de los tratamientos. En la figura 16, se puede observar que las cepas aisladas mostraron las mismas características morfológicas a la cepa BV801, por lo que se considera que los síntomas manifestados fueron efecto de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv.

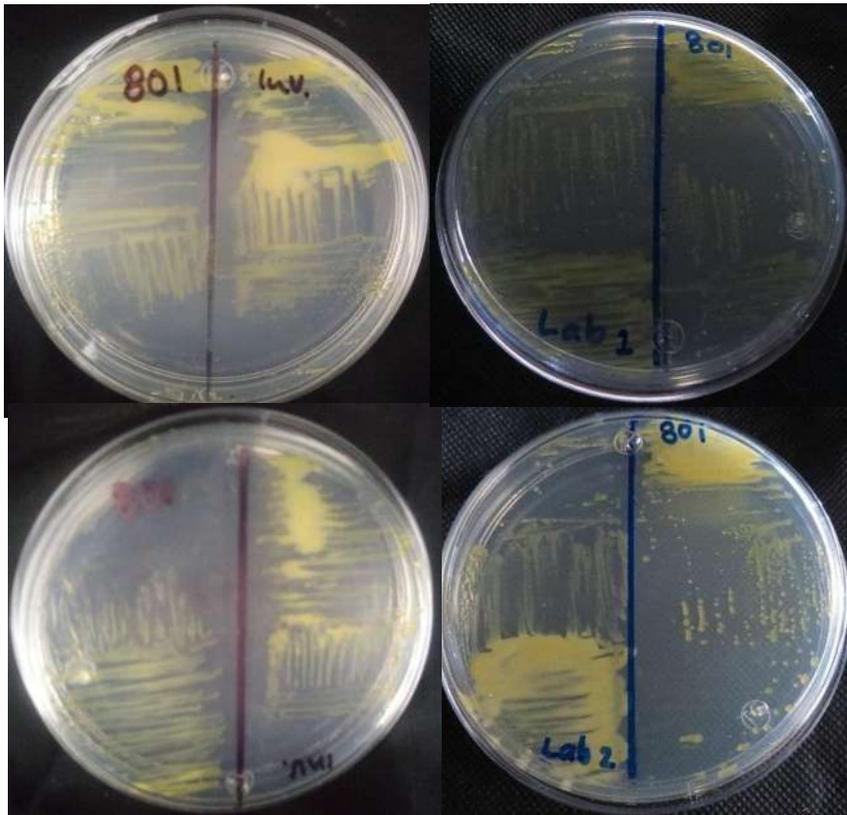


Figura 16. Características morfológicas de la cepa BV801 y las cepas aisladas de tejidos enfermos en las diferentes condiciones en las que se realizó la inoculación: cepa BV801 (801); cepas aisladas de las condiciones de invernadero (Inv); indica la cepa aislada de las condiciones LS (Lab1), cepa aislada de las condiciones LH (Lab 2 ).

### 6.2.5 Conclusiones

Las plantas infectadas con BV801 manifestaron diferente grado de la enfermedad, las manchas de la enfermedad se presentaron de diferente tamaño y aspecto, el tiempo de la aparición de los síntomas varió, estas variaciones fueron efecto de las condiciones de temperatura y humedad a las que fueron expuestas las plantas infectadas.

Se comprobó mediante los postulados de Koch que los síntomas presentados en las plantas fueron consecuencia de la inoculación de la cepa Bv801 de *Xanthomonas*.

Se generaron dos escalas ordinarias cualitativas de daño. La primera de las escalas en ambientes con temperaturas entre 23 y 30°C y humedad relativa entre

los 60 y 90%, esta consistió en seis niveles de daño desde el nivel uno planta sana hasta el seis la planta con 80% de defoliación. La segunda escala en condiciones ambientales con temperaturas cálidas entre los 18 hasta 48°C y una humedad relativa de los 35 a 90%, esta consistió en cuatro niveles de daño en el que uno es planta sana hasta el cuatro el tamaño de las hojas aumentó. En dos o tres hojas manchas marrón cubren en casi en su totalidad la hoja.

### 6.2.6 Bibliografía

- Achicanog, L. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. 54(2); 1251-1273.
- Balogh, B; Thi Thu Nga; y Jeffrey B. Jones, J. (2018). Relative Level of Bacteriophage Multiplication *in vitro* or in Phyllosphere May Not Predict *in planta* Efficacy for Controlling Bacterial Leaf Spot on Tomato Caused by *Xanthomonas perforans*. Frontier Microbiology. 9(); 1-10.
- Bardsley, S y Ngugi, H. (2012). Reability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. Plant pathology. 62(2); 460-476.
- Chew, M; Vega, P Y Palomo, R (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). SAGAPA-INIFAP-CIRNOC. (15); 29-33.
- Galindo, F. (2008). Resistencia inducida por micorrizas en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) ante *Xanthomonas Campestris* ps. *Vesicatoria*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico nacional, México.
- Gaviria, A. (2012). Técnicas para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5 $\alpha$  a partir de aguas residuales. Revista MVZ Cordoba, 17(1); 2852-286.
- González, I; Belkis, Y; y Belkis, P. (2009). Interacción planta-bacterias fitopatógenas: caso de estudio ralstonia solanacearum- plantas hospedantes. Revista de Protección Vegetal. 24(2); 69-80.
- González, M. (2012). Expresión diferencial de genes relacionados con fotosíntesis y defensa inducida por micorrización en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional.
- Hernández, H. (2012). Ficha técnica mancha bacteriana del tomate; bacterial leaf spot. Edo. Méx., Méx. Universidad autónoma Chapingo.

- Obradovic, A; Jones, J; Momol, M; Olson, S; Jackson, L; Balogh, B; Iriarte, F. (2005). Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*. 89 (7); 712–716.
- Ramos, H. (2015). Escala Diagramática de Severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del Maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33 (1); 95-103.
- Ritchie, D. (1995). Bacterial spot. In: Ogawa J.M., Zehr E.I., Bird G.W., Ritchie D.F., Uriu K., Uyemoto J.K. (eds). *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press, St. Paul, MN, USA. 66 (3); 50-52.
- Salazar, L. (2014). Elaboración de escalas diagramáticas de severidad en hoja y tallos para evaluar la enfermedad “mal del pie” (*Gaeumannomyces graminis* Sacc.) Von Arx & d. Oliver var. *gramíneas* en diferentes estados fenológicos del arroz. Tesis de Maestría. Universidad Nacional De Colombia Facultad De Ciencias Agropecuarias.
- Seminis. (2018). La mancha bacteriana. Seminis. Recuperado en <http://www.seminis.mx/recursos/guia-de-enfermedades/tomates/root-knot-2/>
- Vidaver, A; y Lambrecht, P. (2004). Las Bacterias como Patógenos Vegetales. *Trans. Ana María Romero. The Plant Health Instructor*. (); 1-11

### **6.3 Hongos micorrizicos arbusculares y bacteriófagos en control del daño por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en Chile “Chilaca”**

#### **6.3.1 Resumen**

Con la finalidad de evaluar el efecto de los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) en promoción de crecimiento, así como evaluar HMA, bacteriófagos y sus combinaciones en el control del daño de la mancha bacteriana en plantas de Chile chilaca. Se llevaron a cabo dos experimentos en invernadero en un diseño completamente al azar trifactorial (4 niveles de HMA: *Rhizophagus intraradices* Ri, *Funneliformis mosseae* Fm, consorcio Las Campesinas, sin HMA. 2 niveles de bacteriófagos: con y sin. 2 niveles de bacteria: con y sin) con 16 tratamientos repetido 8 veces. Plantas de Chile “chilaca” fueron trasplantadas a contenedores con sustrato estéril; suelo, arena y perlita, se inocularon esporas de HMA (50/80 esporas por maceta) al sistema radicular de las plantas, se dejaron en desarrollo y se midieron variables de crecimiento, hasta 152 y 40 días después de la inoculación de HMA, se inoculó la cepa BV801 de Xcv (2 mL ( $10^7$  UFColonia/mL)), 24 h después se inoculó el bacteriófago XAF18 micro encapsulados en alginato de sodio al 3% (2 mL ( $10^7$  UFPlaca/mL)). A los 21 días después de la infección se realizó un muestreo destructivo para evaluar variables de crecimiento, variables microbiológicas y variables fitopatógenas. Los resultados mostraron que en el primer experimento los tres inóculos promovieron mayor producción de órganos reproductivos en las plantas; las plantas inoculadas con CAM mostraron mayor biomasa seca en raíz y follaje, así como mayor diámetro de tallo en relación a las plantas sin-HMA. En el segundo experimento las plantas inoculadas con Ri presentaron mayor número de hojas en relación a las plantas sin- HMA, además, también tuvieron menor defoliación. En tanto al bacteriófago, este no tuvo efecto en el control de la enfermedad. La combinación Ri+ bacteriófago fue el tratamiento que disminuyó la defoliación de las plantas enfermas y las plantas con la inoculación con CAM fueron las que presentaron menor área foliar dañada, ambos en relación a las plantas control (Sin tratamiento).

### 6.3.2 Introducción

La mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* es una amenaza seria en los campos de producción de chile (*Capsicum annum* L.), en condiciones favorables para su proliferación produce pérdidas de hasta el 50% de la producción (Carrillo *et al.*, 2001). El manejo de la enfermedad se basa principalmente en prácticas culturales y la aplicación de productos químicos (Kuchare, 1994; Quezado *et al.*, 2003; Hernández, 2012), sin embargo, con el uso constante de estos productos genera resistencia de agente patógeno, lo que da como resultado un mal control de la enfermedad y la preocupación por los daños colaterales ocasionados por su uso excesivo (contaminación al medio ambiente, eliminación de bacterias benéficas para la planta, y problemas a la salud humana) (Carrillo *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2012). Por lo que es necesario la búsqueda de alternativas de estrategias eficaces y de menor impacto negativo al medio como por ejemplo estrategias de manejo mediante el control biológico. El uso de bacteriófagos y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), de forma separada se han reportado como herramientas alternativas eficaces para el control de la enfermedad, sin embargo, no se ha evaluado la combinación de estos como una estrategia más sostenibles e integral para el manejo de la enfermedad. Por lo que en este estudio, se evaluaron bacteriófagos XAF18, HMA (*Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* y un consorcio denominado “Las Campesinas” (CAM), y su combinación para reducir la severidad de mancha bacteriana, además de evaluar la promoción de crecimiento con el uso de HMA en plantas en chile variedad Chilaca en dos experimentos realizados en condiciones de invernadero.

### 6.3.3 Metodología

Experimento 1. Se realizó en invernadero en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Se desarrolló en los meses de octubre-abril, con temperaturas de 15°C a los 32 °C.

Experimento 2. Se realizó en un invernadero, dentro de las instalaciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, ubicado en las coordenadas 19°42' longitud norte, 101°09'03.13 latitud oeste a 1941 msnm. Este se desarrolló en los meses de agosto-octubre. Con temperaturas de los 17.6°C a 48°C.

### Diseño experimental

Experimento 1. El diseño experimental se realizó completamente al azar, en un arreglo multifactorial mixto con tres factores: 1) Inoculación de HMA, 2) Infección con la cepa BV801 de Xcv (con y sin Xcv) y 3) Aplicación de bacteriófagos (con y sin fagos) (Cuadro 4). Se generaron 16 tratamientos y se repitió 8 veces. La unidad experimenta consistió en una planta en una bolsa de polietileno con 1.7 kg de sustrato esterilizado.

Experimento 2. El diseño experimental fue completamente al azar, en un arreglo multifactorial mixto con tres factores: 1) Inoculación de HMA: (tres inóculos de HMA y sin HMA). 2) Infección con la cepa BV801 de Xcv (con y sin la inoculación de la cepa bacteriana). 3) Aplicación de bacteriófagos (con y sin fagos). Para un total de 16 tratamientos, cada tratamiento con 8 repeticiones, dando un total de 128 unidades. La unidad experimenta consistió en una planta de chile chilaca en una maceta con 1.6 kg de sustrato.

Cuadro 4. Diseño de tratamientos evaluados en el experimento de HMA como promotores de crecimiento y el efecto bioprotector de los HMA, bacteriófagos y sus combinaciones contra el daño ocasionado por la mancha bacteriana en chile "Chilaca"

Factor HMA	Factor cepa BV801 de Xcv	Factor bacteriófago	Tratamiento	Clave
<i>Rhizophagus intraradices</i>	Con BV801	Con XAF18	1	RI.X.B
		Sin XAF18	2	RI.X
	Sin BV801	Con XAF18	3	RI.B

		Sin XAF18	4	RI
<b><i>Funneliformis mosseae</i></b>	Con BV801	Con XAF18	5	GM.X.B
		Sin XAF18	6	GM.X
	Sin BV801	Con XAF18	7	GM.B
		Sin XAF18	8	GM
	<b>Consortio Las Campesinas</b>	Con BV801	Con XAF18	9
Sin XAF18			10	CA.X
Sin BV801		Con XAF18	11	CA.B
		Sin XAF18	12	CA
<b>Sin HMA</b>	Con BV801	Con XAF18	13	X.B
		Sin XAF18	14	X
	Sin BV801	Con XAF18	15	B
		Sin XAF18	16	Testigo

HMA= Hongos micorrízicos abusculares. Xcv= cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; XAF18 clave del bacteriófago.

## Material biológico

Se utilizaron plantas de chile criollo variedad pasilla, del municipio de Queréndaro, de la cosecha 2016.

Los inóculos de HMA fueron: *Rhizophagus intraradices* (RI) proveniente de un inóculo comercial INIFAP, *Funneliformis mosseae* (GM) y un consorcio denominado “Las Campesinas” (CAM), estos últimos de origen en suelos de cultivo de *Agave cupreata* del estado de Michoacán (Trinidad *et al.*, 2017). El inóculo CAM contiene 15 especies pertenecientes a seis familias de HMA (*Acaulosporaceae*, *Cloroideoglomeraceae*, *Etrophosporaceae*, *Glomeraceae* y *Pacisporaceae*) (Trinidad *et al.*, 2017.)

La cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* utilizada fue del Laboratorio de Fitopatología aislada en el 2015 en Mascota, Jalisco (López, 2016).

Bacteriófagos: en este estudio se empleó el bacteriófago XAF18 específico de la cepa BV801 de Xcv proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del CIATEJ,

aplicados en microencapsulación de alginato de sodio al 3% para su protección contra factores ambientales (Cruz, 2018).

### **Establecimiento del cultivo**

Las semillas se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio (3%), etanol (3%) y agua destilada estéril, se sembraron en charolas plásticas. En el primer experimento el trasplante a macetas se realizó a los 37 días después de la siembra cuando la planta tenía 4 hojas verdaderas.

Para el segundo experimento se siguió el mismo procedimiento, el trasplante se realizó a los 39 días después de la siembra.

### **Condiciones de trasplante de las plantas de Chile en macetas**

En el primer experimento se trasplantó a bolsas con 1.7 kg de sustrato. El sustrato fue una mezcla de suelo, arena y agrolita (6:3:1 v/v). Esta mezcla de sustrato fue esterilizado en autoclave a 120°C por 6 horas a una presión de 1.05 kg cm<sup>-2</sup>.

Para el segundo experimento se trasplanto a una maceta con 1.6 kg de sustrato estéril. El sustrato consistió en una mezcla de suelo, arena y agrolita en una proporción (5:4:1 v/v). Este sustrato fue esterilizado en un equipo eléctrico pro-Grow modelo ss-30 a una temperatura de 190°C por 24 h.

### **Preparación del inóculo de la cepa BV801 de Xcv**

Se inoculó la cepa BV801 de Xcv en medio líquido NYG, se dejó en crecimiento una noche en agitación, se tomaron lecturas de la concentración bacteriana en un espectrofotómetro y se ajustó a una concentración a  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Se realizó el lavado de la solución/inóculo de la bacteria para eliminar impurezas; dos veces con agua estéril y en centrifugación de 15 min a 5000 repeticiones por minuto (rpm) y se dejaron suspendidas en buffer de fosfatos.

## **Multiplicación de bacteriófagos**

La multiplicación de bacteriófagos se realizó por dos días, haciendo dos enriquecimientos bacterianos en el medio nutritivo por día, agregándole de cultivo bacteriano 10% del volumen total, para finalmente conseguir un volumen de 300 mL a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  UFP mL<sup>-1</sup>.

Para purificar los bacteriófagos la solución del matraz se pasó a tubos falcón estériles de 50 mL, se centrifugaron a 13000 revoluciones por minuto (rpm) por 20 min y se filtró en una membrana de 0.22  $\mu$ m, recuperando el sobrenadante, obteniendo así únicamente los fagos (Solís *et al.*, 2016).

## **Enumeración o titulación de la concentración de bacteriófagos XAF18**

Para estimar las unidades de fagos infecciosas, se realizó mediante ensayos de doble placa en agar suave (Kropinski *et al.*, 2009). El ensayo de doble placa consistió en agregar en un tubo de ensaye 4 mL del medio suave y 600  $\mu$ L de cultivo bacteriano (fase de crecimiento logarítmica), se vertió en una caja Petri con medio sólido (NYGA) y se dejó secar.

Para estimar la concentración de fagos en el medio se realizaron diluciones decimales seriadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ ) y de cada dilución se tomaron 5  $\mu$ L y se dejó caer esa gota en la caja Petri en la que se vertió el medio suave. Se dejó en incubación a 27°C por 24 a 48 h. Pasado este tiempo se observaron los halos de lisis de los fagos en cada dilución. En la última dilución donde se observó halos (lisis de los fagos), se contó el número halos y se estimó las UFP (unidades formadoras de placa) por mL.

## **Encapsulamiento de los bacteriófagos XAF18**

Para el encapsulamiento de los fagos se siguió la técnica empleada por Cruz (2017). En una probeta de 100 mL se agregó 70 mL de bacteriófagos a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  UFP mL<sup>-1</sup> y 30 mL de alginato de sodio al 3% (Anexo 5) posteriormente se vació la mezcla en un tubo de vidrio y se puso una boquilla pequeña. Se asperjó en una caja Petri de 150 mm con 100 mL de cloruro de calcio

(CaCl) a 0.5 M (Anexo 6), se agitó y se recuperó en un vaso de precipitado, este procedimiento se repitió hasta terminar el volumen de fagos. Se vaciaron en frascos transparentes de 500 mL y se dejaron en refrigeración durante 24 h, después se decantó el exceso de CaCl y se realizó la titulación de los fagos por diluciones decimales seriadas en doble placa de agar suave.

En la Figura 17, se muestra un ensayo de doble placa de agar suave donde se aplicó por goteo (5  $\mu$ L) de las diluciones decimales seriadas del bacteriófago con y sin el microencapsulado y por último el microencapsulado sin fagos (solo agua destilada estéril). En la tercera línea de la figura 17, donde se realizó el goteo de las diluciones del microencapsulado (sin fagos) no se observó la inhibición de crecimiento de la cepa BV801 de Xcv por lo que descartó efecto del alginato de sodio o el cloruro de calcio sobre el crecimiento bacteriano de Xcv.

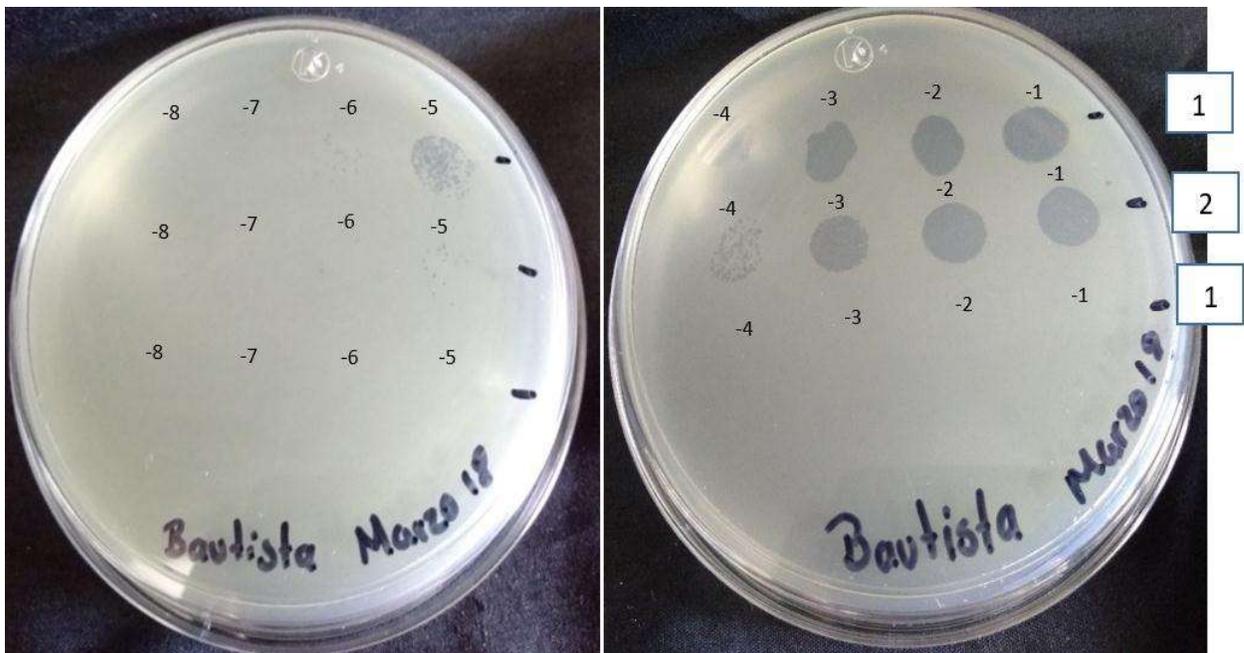


Figura 17. Efecto de los bacteriófagos encapsulados, sin encapsulados y el encapsulado (sin fago) a la cepa bacteriana Xcv en ensayo de doble placa en agar suave:(1). Lisis de los bacteriófagos sin encapsular; (2). Lisis de los bacteriófagos encapsulados con alginato de sodio al 3% y (3). Únicamente el encapsulado (sin fago) con agua estéril; números indican las diluciones decimales.

### Inoculación de los hongos micorrízicos arbusculares en las plantas de Chile

Al momento del trasplante de las plantas de Chile se inocularon los HMA al sistema radicular con 50 esporas para el primer experimento y 80 esporas para el segundo experimento de cada inóculo de HMA. Para inocular el número de esporas requeridas en los experimentos se realizó el conteo de esporas de los inóculos tomando 10 g de suelo seco para extraer esporas mediante la técnica de tamizado húmedo y decantación de Gerdemann y Nicholson (1963) en combinación con la técnica de flotación en azúcar Walker (1997). Las esporas fueron contadas en un estereomicroscopio (Modelo VE-S5C; marca VELAB).

### **Inoculación de la cepa BV801 de Xcv**

Las plantas se inocularon a las 5 de tarde por aspersión haz-envés en la tercera hoja bien formada contando de arriba hacia abajo del ápice principal de la planta. Las plantas testigo/control se asperjaron con agua destilada esteril (simulación de inoculación).

Experimento 1. La inoculación bacteriana se realizó a los 152 días después del trasplante (ddt) con una suspensión de la cepa BV801 de Xcv ajustada a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> a razón de 2 mL por planta.

Experimento 2. La inoculación bacteriana se realizó a los 40 ddt. Se asperjaron primero las plantas con agua esteril y se taparon con bolsas plásticas, después se hizo la inoculación de Xcv en las plantas y también se taparon por 14 h, esto con la finalidad de favorecer la infección de Xcv en las plantas.

## Inoculación del bacteriófago XAF18

Los bacteriófagos se aplicaron 24 h después de la inoculación de la bacteria BV801, mediante la técnica de aspersión haz-envés en una solución ajustada a  $1 \times 10^7$  y aplicando 2 mL por planta.



Figura 18. Detalle de la inoculación de la cepa BV801 de Xcv y bacteriófagos en las plantas de chile chilaca: (a) Inoculación de la cepa BV801; (b) Inoculación de la solución del bacteriófagos XAF18, 24 h después de la inoculación de Xcv.

## Manejo agronómico

Experimento 1. Las plantas de chile se estuvieron regando cada 9 días aproximadamente con 50 mL de agua corriente, a partir de los 30 ddt hasta los 75 DDT se fertilizaron con nitrógeno (N) (urea) aplicado cada 15 días,  $32 \text{ kg ha}^{-1}$  (INIFAP, 2010).

Experimento 2. Las plantas se regaron diariamente con 100 mL de agua destilada. Se fertilizaron tres veces a partir de la tercera semana con solución nutritiva Hoagland y Arnon (1938) (Anexo 12), no se le aplicó fósforo para promover la colonización micorrízica.

## **Variables respuestas evaluadas en los experimentos**

Variables de crecimiento: Para determinar el efecto de la micorrización sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas de chile, se evaluaron las siguientes variables:

**Altura** de la planta (AP), esta se realizó con un flexómetro partiendo de la base del tallo hasta el ápice de la planta. **Diámetro del tallo** (DP) se midió en la base del tallo con un vernier digital.

Experimento 1. Se midieron a los 2, 46, 73, 98 y 115 días después del trasplante (ddt). La altura de la planta también se midió a los 173 ddt.

Experimento 2. Estas variables se midieron a los 3, 10, 17, 24, 31, 38 y 60 días después del trasplante.

Conteo de órganos reproductivos. Se contó de manera directa el número de botones, flores y frutos de chiles.

Al finalizar los experimentos se registró biomasa fresca, biomasa seca, volumen de parte aérea y raíz; y longitud de raíz. En experimento 1 estas variables se realizaron a los 152 ddt y 21 días después de la inoculación de Xcv (ddi). En experimento 2 se realizó el registro de las variables de respuesta a los 62 ddt y 21 ddi; también se midió el área foliar y se contó el número de hojas.

Biomasa fresca y seca de la parte aérea y raíz. Se recuperó la parte aérea y raíz. La raíz se lavó para quitar el sustrato. Se pesaron en una balanza digital en fresco y se pusieron a secar en estufa a 60°C hasta que su peso fue constante.

Longitud de raíz. Esta se midió con una con una regla graduada de 30 cm.

Volumen de parte aérea de la planta y raíz. Este fue calculado mediante desplazamiento de agua en una probeta graduada de 100 mL.

## **Variables de respuesta del daño de la mancha bacteriana**

Experimento 1. No se cuantificaron debido a que no se manifestaron síntomas de la enfermedad.

Para el experimento 2 se midieron las siguientes variables:

**Nivel de daño.** Inicialmente se utilizaría la escala ordinaria de daño elaborada en el capítulo 2 (de cuatro niveles), sin embargo, los síntomas de la enfermedad fueron distintos, imposibilitando el uso de las escalas anteriores.

**Número de hojas caídas.** Esto se realizó de forma directa, contando el número de hojas que se encontraban en la superficie del sustrato y se verificaba contando los nudos del tallo en donde no había hojas.

**Número de hojas con manchas.** Se contabilizó el número de hojas que presentaban manchas.

**Manchas necróticas.** Estas se contaron de manera directa y se contabilizaron por cada hoja que presentaba manchas. No se contabilizaron las manchas cloróticas porque al momento del levantamiento del experimento había muy pocas plantas que las presentaban.

**Área foliar dañada.** Se estimó el área manchada de las hojas que presentaron manchas mediante el software BioLeaf, BioLeaf estimó el porcentaje de daño mediante una foto de la hoja y posteriormente se midió el área foliar de la hoja en con un integrador de área foliar. Y se calculó el área foliar dañada por la mancha bacteriana (X) con la siguiente formula:

$$x = \frac{\% \text{ de área dañada} * \text{área de hoja}}{100} .$$

## **Verificación de la presencia de la cepa BV801 de Xcv**

Una vez que los síntomas se manifestaron, se verificó que éstos fueran efecto de la cepa BV801 de Xcv, para lo cual se siguieron los criterios de Robert Koch: se tomaron dos hojas con manchas necróticas por cada tratamiento infectado con la

cepa BV801. Las hojas se lavaron y desinfectaron con etanol (3%), hipoclorito de sodio (2%) y agua estéril, se maceraron en un mortero estéril, al macerado se les agregaron 2 mL de NYG, se tomó 1 mL y se cultivó con un dispersador celular en una caja Petri con medio NYGA, se dejó en crecimiento 2 días, y se aislaron las cepas morfológicamente iguales con las características de la cepa BV801 de Xcv.

### **Presencia del fago en los tejidos vegetales**

Se realizó el aislamiento del fago de las hojas donde se inoculó, siguiendo la técnica de Solís *et al.* (2016). Se tomaron dos hojas por cada tratamiento donde se aplicaron fagos, las hojas se lavaron y desinfectaron con agua destilada estéril, alcohol e hipoclorito de sodio, se maceraron las hojas en un mortero estéril, se les agregó 3 mL de NYG, se tomaron 2 mL del macerado y se colocaron en tubos de 15 mL, se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se hicieron diluciones decimales seriadas en ensayos de doble placa en agar suave.

### **Variables microbiológicas**

Colonización micorrízica: Esta variable es de importancia para evaluar la relación del inóculo de los HMA y planta. Se midió por porcentaje, tomando 2 g de raíz de cada planta, realizando la decoloración y tinción por el método descrito de Phillips y Hayman (1970).

Una vez hecha la tinción de las raíces se cortaron 90 segmentos de 1 cm de cada raíz, se colocaron en tres portaobjetos y se cubrieron para su visualización en un microscopio óptico (modelo VE-BC3; marca VELAB). Solo se montaron y visualizaron tres repeticiones de cada tratamiento.

Para determinar el porcentaje de colonización micorrízica, se contabilizaron los segmentos de raíz que al menos tuvieran una estructura de del hongo micorrízico arbuscular (hifas, vesículas, esporas y/o arbusculos).

Densidad de esporas: La esporulación de los HMA es un parámetro generalmente utilizado para conocer la actividad micorrízica a lo largo del periodo de tiempo en que se sostuvo la simbiosis (Hernández, 2011).

El conteo de esporas por la técnica de extracción de esporas por la técnica de tamizado y decantado en húmedo (German y Nicolson, 1963) en combinación con la técnica en flotación en sacarosa (Walker, 1997). El conteo se realizó de forma visual vaciando el tamizado en la base de una caja Petri cuadrículada y observándolo bajo un microscopio estereoscopio (modelo VE-S5C; marca VELAB) con ayuda de un contador manual, la extracción de esporas solo se realizó de tres repeticiones de cada tratamiento y se realizaron 3 réplicas.

### **6.3.4 Resultados**

#### **6.3.4.1 Determinación del crecimiento y desarrollo por efecto de los HMA en plantas de chile bajo condiciones de invernadero**

En todas las variables evaluadas se analizaron los supuestos de confiabilidad y se realizaron un análisis de varianza simple y uno multifactorial (Anova), así como la comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en el programa estadístico StatGraphics Centurión XV®.

#### **6.3.4.2 Experimento 1. Los HMA como promotores de crecimiento en plantas de chile “Chilaca”: invernadero en Zapopan, Jalisco.**

La figura 19 presenta el crecimiento de las plantas de chile en los cuatro niveles de la inoculación de los HMA, al finalizar el experimento no se encontraron diferencias estadísticas en los tratamientos. La altura en la primera medición fue a partir de 5.0 cm y la media al final de experimento fue de 38.52 cm, la tasa promedio de crecimiento por día fue de 0.1946 cm.

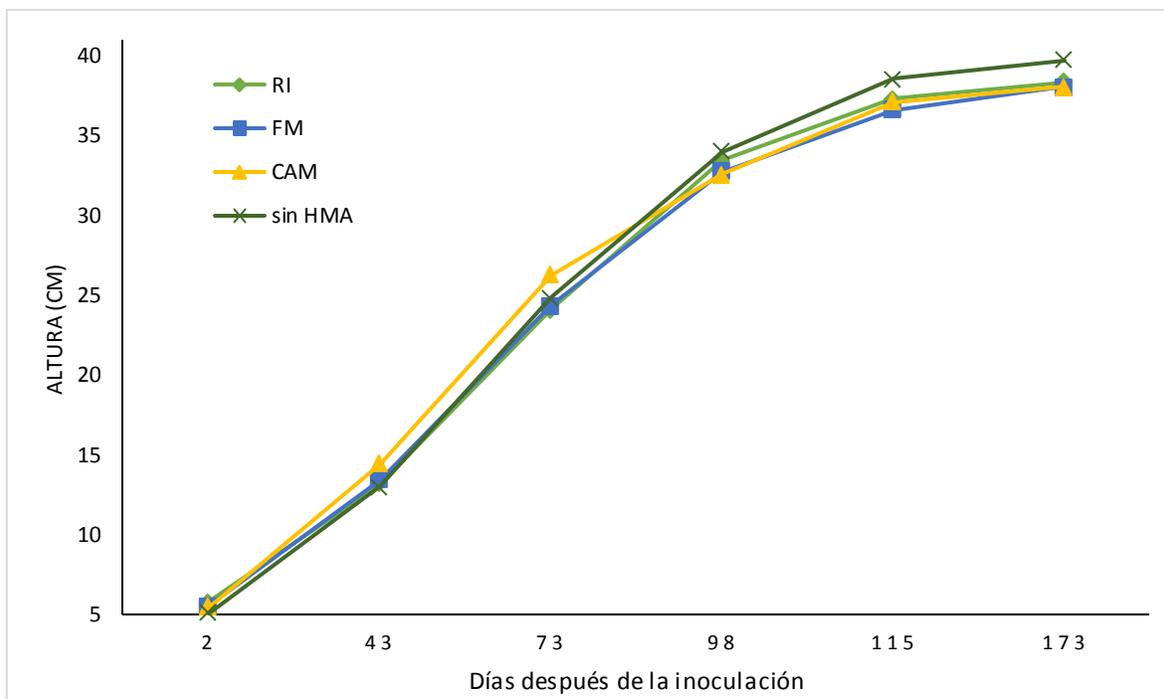


Figura 19. Comparación de la evolución de la altura de las plantas por efecto de la inoculación de HMA. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA (sin la inoculación de HMA) a partir de los 2 hasta los 173 días después de la inoculación de los HMA en condiciones de invernadero. Análisis estadístico Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Respecto al crecimiento de la planta de acuerdo con el grosor del tallo de la planta se presenta en la figura 20, se observó que al final del experimento las plantas inoculadas con el consorcio Las Campesinas (CAM) presentaron mayor diámetro de tallo respecto a las plantas sin la inoculación de HMA (sin HMA). Este resultado y considerando la altura de las plantas sugieren una idea del porte de las plantas, sin la inoculación de HMA tuvieron mayor altura, sin embargo estaban más delgadas. La dinámica de crecimiento al inicio del experimento mostró una media de 1.37 mm y al final del experimento una media de 4.34 mm, con una tasa de crecimiento por día de 0.0222 mm.

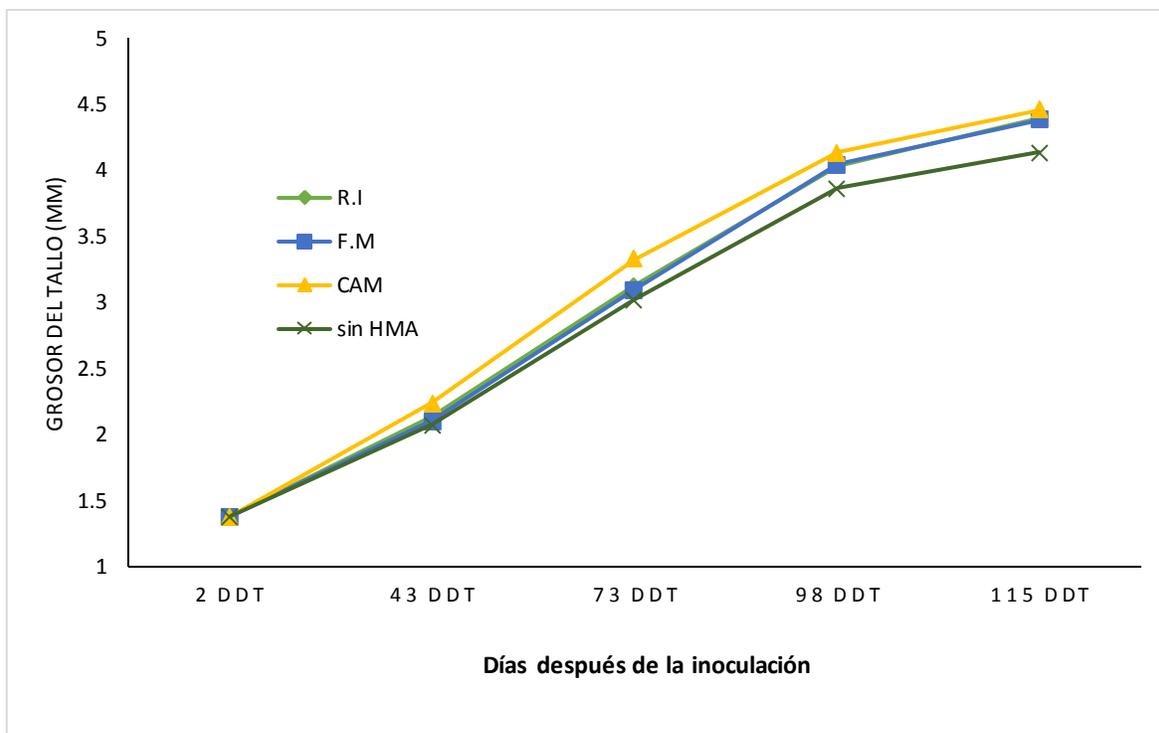


Figura 20. Evolución de crecimiento de diámetro del tallo (DT) a través de tiempo por efecto de la inoculación de HMA. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA. En condiciones de invernadero. Análisis estadístico por el factor HMA ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

En el Cuadro 5, se presenta el efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas de chile tomando en cuenta las siguientes variables: número de órganos reproductivos (NOR), biomasa fresca de follaje (BFA), biomasa seca de follaje (BSA), volumen de follaje (VA), longitud de raíz (LR), volumen de raíz (VR) biomasa fresca de raíz (BFR), biomasa seca de raíz (BSR). El análisis de varianza no mostró diferencia ( $P \geq 0.05$ ) en las variables BFA, VA, LR, VR, BFR, pero si en las variables de biomasa (BSF y BSR), en las cuales las plantas inoculadas con el consorcio (CAM) fueron las que presentaron los mayores valores. En la variable número de órganos vegetativos, una de las variables de mayor importancia las plantas inoculadas con HMA (en los tres inóculos) presentaron significativamente mayor número de órganos reproductivos respecto al testigo (sin HMA).

Cuadro 5. Comparación de las variables de crecimiento y desarrollo en plantas de chile Chilaca a los 173 días después de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae*, consorcio Las Campesinas) y sin la inoculación de HMA bajo condiciones de invernadero.

T	Órganos reproductivos	Biomasa Fresca Follaje (g)	Biomasa Seca Follaje (g)	Volumen Follaje (cm <sup>3</sup> )	Longitud de Raíz (cm)	Volumen de raíz (cm <sup>3</sup> )	Biomasa fresca de raíz (g)	Biomasa seca de raíz (g)
RI	26.0±2.2 B	9.9±0.5 A	2.55±0.11 AB	10.53±0.4 A	19.42±0.3 A	3.58±0.2 A	4.39±0.3 A	1.49±0.12 A
FM	24.9±1.6 B	11.51±0.5 A	2.63±0.12 AB	11.45±0.4 A	20.03±0.3 A	4.21±0.2 A	5.05±0.3 A	1.48±0.12 A
CAM	26.1±1.4 B	10.91±0.5 A	2.73±0.12 B	11.50±0.3 A	19.43±0.4 A	4.65±0.4 A	4.75±0.4 A	1.59±0.11 B
Sin HMA	19.6±1.7 A	9.72±0.6 A	2.22±0.08 A	10.55±0.6 A	20.97±0.3 A	4.49±0.3 A	4.93±0.3 A	1.42±0.08 A

T= Tratamiento (inóculos de HMA): RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio “Las Campesinas”) y sin HMA. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas para los niveles de HMA, Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Signos  $\pm$  indican el error estándar.

El consorcio Las Campesinas (CAM), fue el más efectivo para promover el crecimiento vegetal reflejándose en mayor grosor de tallo, biomasa seca de follaje y raíz respecto a las plantas sin inoculación de HMA, esto concuerda con Contreras *et al.* (2013) en que plantas de chile fueron inoculadas con diferentes consorcios micorrízicos, la inoculación tuvo un efecto positivo (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) sobre diámetro de tallo, área foliar, peso seco de follaje y peso seco de raíz. Reyes *et al.* (2016), obtuvieron mayor crecimiento de la planta de chile serrano

(mayores valores de altura de planta, diámetro de tallo y número de hojas) micorrizadas con un consorcio micorrízico proveniente de suelos con plantaciones de *Agave cupreata*, respecto a plantas sin HMA y en chile poblano con el mismo consorcio, las plantas inoculadas solo presentaron mayor altura de la planta respecto a las plantas sin HMA.

Los tres inóculos mostraron un efecto positivo en las variables de crecimiento de la planta, al presentar mayor número de órganos reproductivos (botones, flores y frutos) respecto al testigo (sin HMA), esto concuerda con Díaz *et al.* (2013) que tuvieron un incremento de 30% en el peso de frutos de chile micorrizados con *Rhizophagus intraradices* en comparación a plantas sin colonización, Carrillo *et al.* (2014) también reportan un aumento en rendimiento del 30% en plantas de tomate inoculadas con *R. intraradices*. Otros autores han demostrado, en especies ornamentales (Davies *et al.*, 2000) y en fresa (Stewart *et al.*, 2005), mayor productividad con *R. intraradices*. Esta respuesta de mayor producción de órganos reproductivos puede estar estrechamente relacionado con una mejor condición nutricional de la planta, lo que podría ser adicionado dentro de las prácticas de producción en Chile.

### **Colonización de HMA**

Para el análisis de las variables de porcentaje de colonización se transformaron los datos utilizando  $\sqrt{n+\frac{1}{2}}$  para que se cumplieran los supuestos del análisis de varianza.

De acuerdo al análisis de varianza se mostraron diferencias significativas (Fig. 21), el inoculó FM presentó mayor colonización en las raíces de chile “chilaca” con un 54.34%, respecto a los inóculos consorcio CAM y RI con 41.73 y 42.31 respectivamente; las raíces de plantas sin HMA no presentaron colonización.

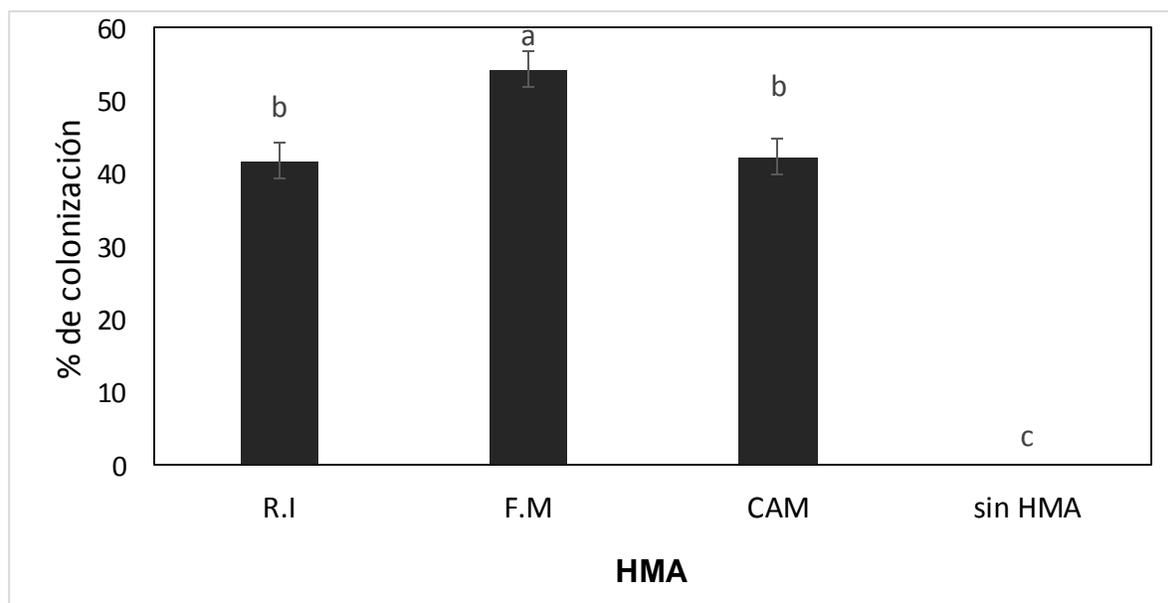


Figura 21. Colonización micorrízica con los diferentes inóculos de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en raíces de chile chilaca a 173 días después de inoculadas en condiciones de invernadero. *Rhizophagus intraradices* (R.I), *Funneliformis mosseae* (F.M), Las Campesinas (CAM) y sin inóculo (sin HMA). Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Este análisis microbiológico muestra que las plantas de chile chilaca a los 173 días después de la inoculación con HMA (ddi) presentaron un porcentaje de colonización mayor al 40%. El porcentaje de colonización y el efecto de este en las plantas tiene gran variación de acuerdo a la especie de hospedante y del huésped, así como las condiciones edafoclimáticas y el manejo agronómico (Alarcón *et al.*, 2002; Yildiz *et al.*, 2010). En trabajos realizados por: Pozo *et al.* (2002), reportan colonización de *Funneliformis mosseae* y *Rhizophagus intraradices* de 50 y 56% respectivamente a los 42 ddi en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), Manjarrez *et al.* (1999), a los a los 156 días después de la inoculación con tres

especies de *Glomus* en chile serrano reportó colonización mayor al 70 %. Por su parte Reyes *et al.* (2016), inocularon *Rhizophagus intraradices* en plantas de chile, a los 56 (ddi) reportaron colonización en chile serrano de 33.60 % y en chile ancho San Luis de 77.66% bajo las mismas condiciones de manejo, además registraron variación de porcentajes de colonización utilizando diferentes consorcios de HMA en las dos variedades de chile, además, la plantas con mayor porcentaje de colonización no mostraron mayor crecimiento. Gutiérrez (2016), inoculó *Rhizophagus irregularis (Ri)*, un consorcio con 12 especies en plantas de chile chilaca, a los 115 días después de la inoculación la colonización Ri fue de 25% y 18% del consorcio. Las plantas inoculadas con el consorcio tuvieron mayor biomasa seca de raíz y las inoculadas con el Ri tuvieron menor biomasa de raíz.

### Densidad de esporas

La esporulación de los HMA es un parámetro generalmente utilizado para conocer la actividad micorrízica a lo largo del periodo de tiempo en que se sostuvo la simbiosis (Hernández, 2011). El análisis de varianza mostró diferencias significativas en el factor densidad de esporas de los HMA (Fig. 22), en el cual el inoculo Ri mostró mayor número de esporas con una media de 93.88 esporas en 100 g de suelo seco, respecto a los inóculos FM y el consorcio quienes presentaron 23.88 y 23.33 esporas 100 g de sustrato respectivamente. En el sustrato de plantas no inoculadas no se encontraron esporas.

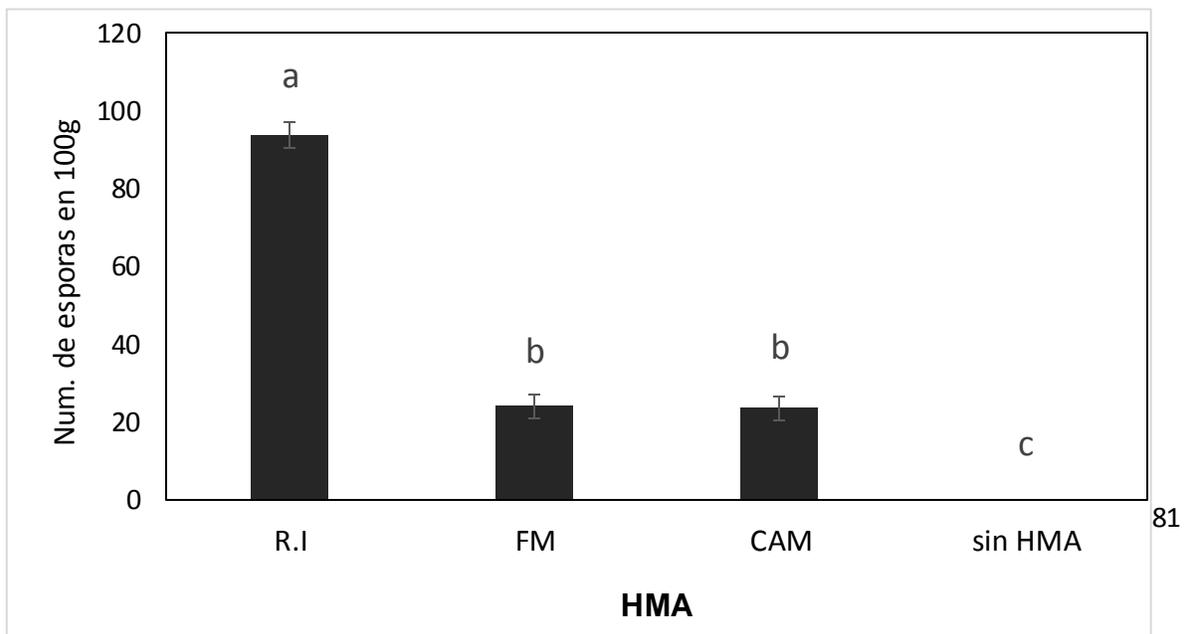


Figura 22. Densidad de esporas de los hongos micorrízicos arbusculares inoculados a 173 días después de inoculadas en plantas de chile “Chilaca”, en condiciones de invernadero. Inoculos evaluados: *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (FM), Las Campesinas (CAM) y sin inoculo (sin HMA). Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

### **Evaluación de la interacción Planta-Xcv-HMA y bacteriófago**

En este experimento a pesar de que se realizó la inoculación de Xcv y se buscaron las condiciones apropiadas para favorecer la infección, los síntomas de la mancha bacteriana no se manifestaron. Esto pudo deberse a que las condiciones de temperatura y humedad no fueron las idóneas para la proliferación de *Xanthomonas* (Balogh, 2004; Hernández, 2012), además recordando el método de infección utilizado fue aspersión haz-envés, por lo que la bacteria entra a través de estomas. La cutícula de la hoja sufre cambios fisiológicos y estructurales por factores genéticos, fisiológicos y ambientales, durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Petit *et al.*, 2007; Isaacson *et al.*, 2009), La cutícula es un compuesto constituido principalmente de dos tipos de polímeros lipofílicos, cutina y ceras cuticulares (Lee *et al.*, 2009), las ceras cumplen un papel clave en la reducción de la permeabilidad al agua, especialmente las ceras epicuticulares que regulan la capacidad de la superficie para la evapotranspiración, estas capas naturales de la filósfera actúan como una eficaz barrera hidrofóbica protectora para minimizar la pérdida de agua por evapotranspiración y también la pérdida de otros gases como CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Tafolla, *et al.*, 2013). Por lo que a los 153 días que se realizó la inoculación pudo dificultarse la entrada de bacteria al interior de la hoja, debido a los cambios en la cutícula de la hoja, además la temperatura y humedad no fueron idóneos para la promover la infección.

Por lo que en este experimento no hubo efecto de la bacteria y el bacteriófago, por lo que solo se evaluó las variables del crecimiento y desarrollo de las plantas por el factor HMA.

#### **6.3.4.3 Conclusiones experimento 1. Los HMA como promotores de crecimiento en plantas de chile “chilaca”: invernadero en Morelia, Michoacán.**

Las plantas presentaron una colonización entre 41 a 54% a los 173 días después de la inoculación. El sustrato inoculado con *Rhizophagus intraradices* presentó mayor número de esporas con relación a las *Funneliformis mosseae* y el consorcio las Campesinas.

La inoculación de HMA promovió la formación de órganos vegetativos comparado con plantas sin-HMA, Además las plantas inoculadas con el consorcio las “Campesinas” presentaron mayor grosor de tallo y pesos en biomasa seca de follaje y raíz, por lo anterior se concluye que la simbiosis micorrízica tuvo un efecto positivo en promoción de crecimiento de las plantas de chile “Chilaca”.

#### 6.3.4.4 Experimento 2. Efecto de los HMA y bacteriófagos en el control de la mancha bacteriana en chile chilaca

La figura 23 muestra la dinámica de crecimiento en plantas de chile con la inoculación de los HMA y sin- HMA. El análisis de varianza no mostró diferencias en el crecimiento de las plantas en los diferentes tratamientos. Se observa que hay una tendencia; las plantas sin la inoculación de HMA (sin HMA) presentan los mayores valores en altura de la planta y las plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae* (FM) presentaron los valores más bajos.

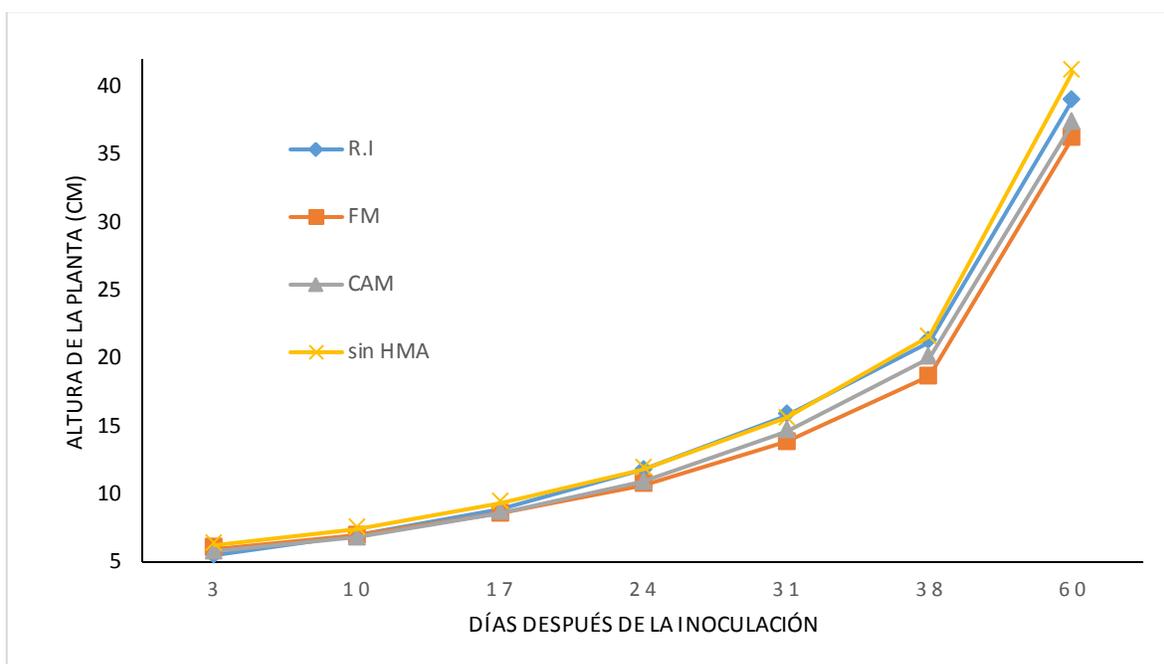


Figura 23. Evolución de la altura de las planta por efecto de la inoculación de HMA a través del tiempo. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA (sin la inoculación de HMA), en condiciones de invernadero. Análisis estadístico por factor HMA ( $P \leq 0.05$ , Tukey).

De acuerdo con el crecimiento evaluando diámetro de la planta (Fig. 24). De acuerdo con el análisis estadístico (Anova) las plantas inoculadas con *Funneliformis mosseae* presentaron diferencias estadísticas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) al

presentar el menor diámetro de tallo respecto a las plantas de los demás tratamientos (RI, CAM y sin HMA).

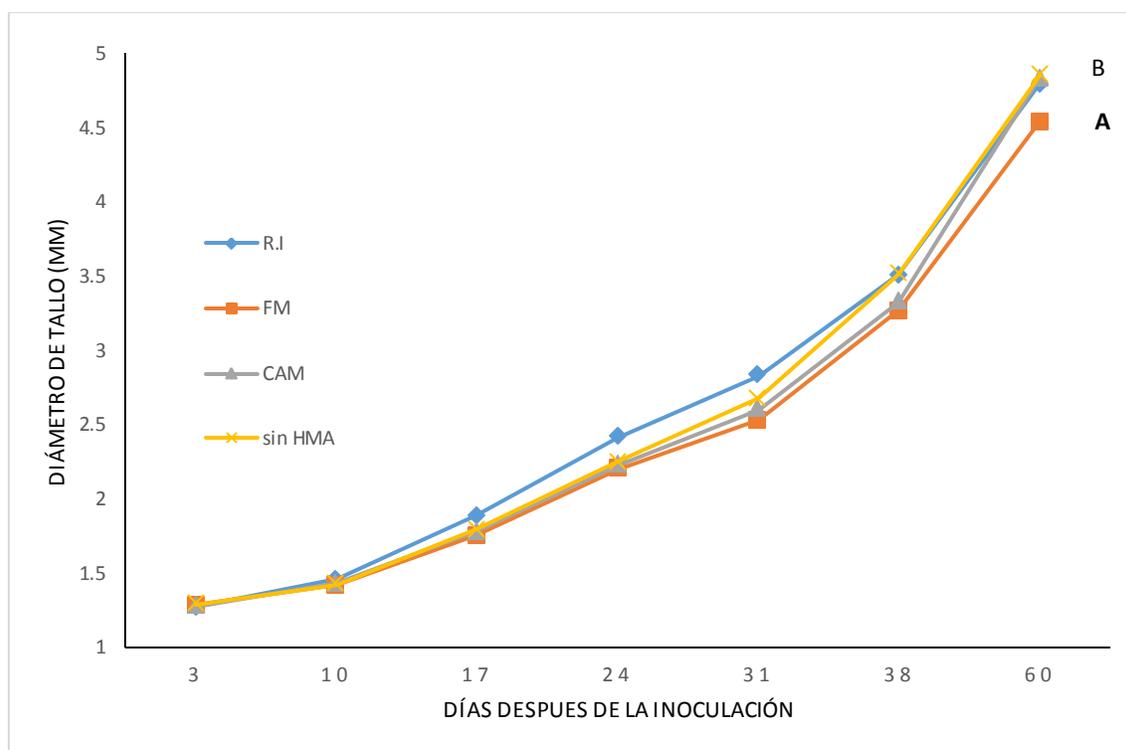


Figura 24. Evolución de diámetro del tallo por efecto de la inoculación de HMA. Inóculos: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA (sin la inoculación de HMA), en condiciones de invernadero. Análisis estadístico para los niveles del factor HMA. Letras diferentes muestran diferencias significativas a los 60 días después de la inoculación de los HMA según Tukey, ( $P \leq 0.05$ ).

En el Cuadro 6 se presenta el efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas de Chile. De acuerdo con el análisis de varianza, las plantas micorrizadas con los HMA presentaron mayor número de hojas que las plantas sin HMA. En las demás variables solo se mostró una tendencia de las plantas inoculadas con RI, las cuales presentan los mayores valores en casi todas las variables analizadas. El inóculo FM presentó los valores más bajos en las variables de biomasa fresca y seca tanto de raíz y follaje.

Cuadro 6. Comparación de las variables de crecimiento y desarrollo en plantas de chile “chilaca” a los 60 días después de la inoculación de diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (FM), consorcio “Las Campesinas” (CAM) y sin la inoculación de HMA (sin HMA).

T	Núm. Hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Biomasa fresca follaje (g)	Biomasa seca follaje (g)	Longitud raíz (cm)	Volumen de raíz (cm <sup>3</sup> )	Biomasa fresca raíz (g)	Biomasa seca raíz (g)
RI	13.3±0.4 B	151.87±6.78 A	13.90±0.10 A	2.58±0.12 A	24.61±0.58 A	14.09±0.61 A	15.00±0.68 A	1.27±0.062 A
FM	12.3±0.3 AB	133.95±6.20 A	12.06±0.09 A	2.23±0.11 A	25.29±0.55 A	12.53±0.67 A	13.29±0.72 A	1.15±0.063 A
CAM	11.5±0.5 AB	136.52±6.40 A	13.27±0.11 A	2.35±0.12 A	25.08±0.58 A	14.68±0.57 A	15.36±0.63 A	1.23±0.056 A
Sin HMA	11.2±0.5 A	133.75±6.31 A	13.28±0.10 A	2.46±0.11 A	23.45±0.56 A	14.06±0.61 A	14.75±0.63 A	1.22±0.058 A

T= Tratamientos (inóculos HMA): RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas) y sin HMA. Letras distintas indican diferencias significativas para los niveles del factor HMA de acuerdo la prueba Tukey, ( $P \leq 0.05$ ). Signos  $\pm$  indican el error estándar.

En este experimento solo se vio reflejado efecto de los HMA en el crecimiento de las plantas en número de hojas. En las demás variables no se vio reflejada el efecto en el crecimiento de los HMA. Respecto a la colonización micorrízica, RI fue el inóculo que presentó los mayores valores.

En este caso las condiciones edafoclimáticas en el que se desarrollaron los experimentos fueron diferentes respecto al primer experimento; época del año, sustrato, duración de los experimentos, clima, fertilización. Estos factores influyen

en el efecto de la micorrización en las plantas, en algunos casos unas especies de HMA se adapta mejor a ciertas condiciones edafoclimáticas, llegando a ser más beneficioso para la planta y en otros casos pasa lo contrario (Azcón *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2009).

Existen diferencias en el proceso de colonización de las distintas cepas de HMA, los cuales se evidencian en el comportamiento fúngico, agronómico y bioquímico (Rodríguez *et al.*, 2007).

La colonización micorrízica se evaluó a los 60 días después de la inoculación (ddi) de acuerdo al análisis estadístico (Tukey 95% de confianza) (Fig. 25) los inóculos que tuvieron mayor colonización en las plantas de chile chilaca fueron: *Rizopagus intraradices* y el consorcio Las “Campesinas”.

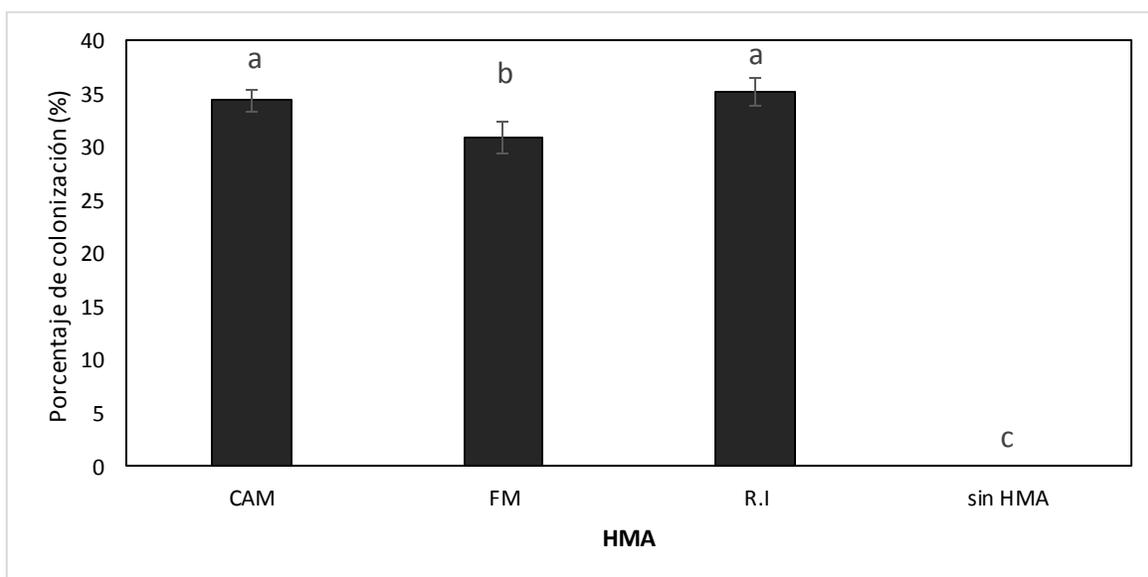


Figura 25. Colonización de los hongos micorrízicos arbusculares en plantas de chile Chilaca a los 60 días después de inoculadas, en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En relación a la colonización del experimento uno evaluado a los 172 ddi, en este experimento (evaluado a los 60 ddi) hubo menor colonización. Esto se debe a que el proceso de colonización es complejo y requiere tiempo para establecerse la simbiosis, Beltrán *et al.* (2013) en plantas de papaya (*Carica papaya* L.) bajo

condiciones de invernadero observaron que las plantas a partir del quinto ddi presentaron colonización del 7% y a través de tiempo el porcentaje de colonización fue de forma ascendente hasta 45 ddi en el que las plantas presentaron un porcentaje de colonización de 37%. En plantas de Chile Tena *et al.* (2016), en dos variedades de Chile bajo condiciones de invernadero observaron mayor crecimiento desde las tres semanas en plantas inoculadas con HMA por lo que a las tres semanas se consideró funcional la simbiosis.

### **Densidad de esporas de los HMA**

La densidad de esporas se contabilizó en 100 g de sustrato seco, de acuerdo al análisis estadístico (Fig. 26) las plantas inoculadas con CAM y con RI presentaron mayor densidad de esporas; 26.66 y 23.33 respectivamente en relación a las inoculadas con FM. La esporulación de HMA al igual que la colonización es afectada por diversos factores como por ejemplo las condiciones climáticas (temperatura, humedad), condiciones del suelo (pH, materia orgánica y disponibilidad de nutrientes) la planta (síntesis de metabolitos secundarios) y la especie de hongo micorrizico arbuscular que coloniza (Scervino *et al.*, 2005; Barrer, 2009). Ley *et al.* (2015), mostraron que en plantas de tomate, la esporulación de *Rhizophagus intraradices* (Ri) fue mayor en comparación a otras especies de *Glomus*, sin embargo en etapas tempranas puede ocurrir lo contrario. Lo que indica que Ri esporula más lentamente y alcanza niveles de esporulación mayores. Referente a la densidad de esporas del consorcio, recordando que este conformado por 15 especies diferentes, varios autores señalan que aunque no hay una especificidad del planta-HMA, si hay una afinidad a determinada especie y la esporulación va relacionada a la especie de HMA que coloniza (Ramirez, 2010; Yildiz *et al.*, 2010).

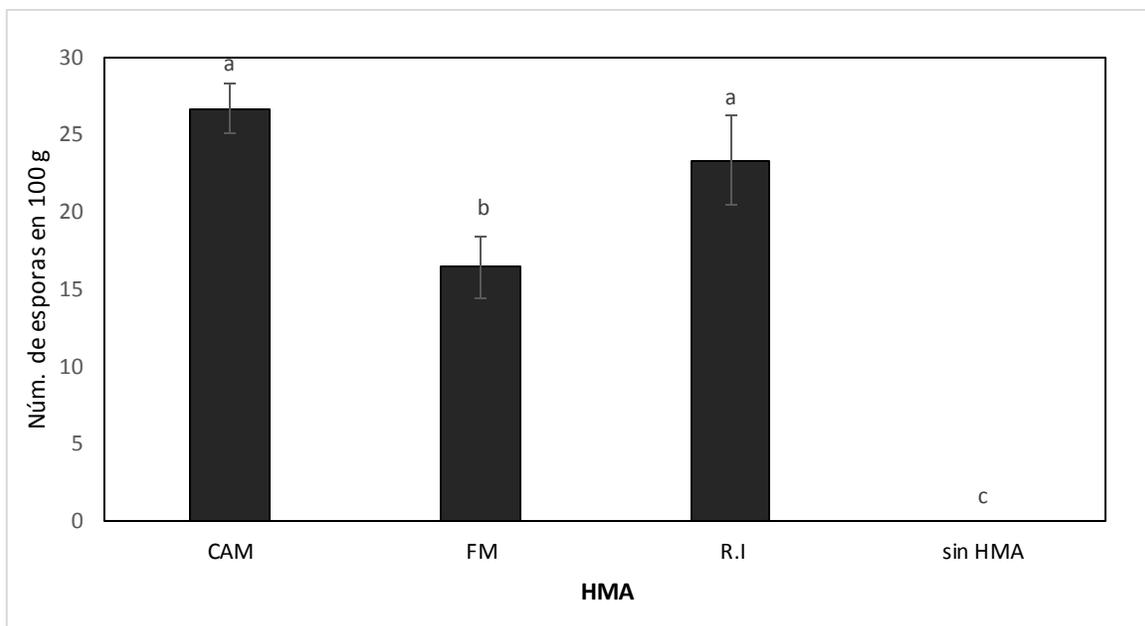


Figura 26. Densidad de esporas de hongos micorrízicos arbusculares en 100 g de sustrato a los 60 días después de inoculadas en plantas de chile “Chilaca” en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas según Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### 6.3.4.5 Evaluación de interacción Planta-Xcv-HMA y bacteriófagos en el crecimiento vegetal

Se evaluaron las variables de crecimiento por los factores de Xcv y bacteriófagos con la finalidad de determinar el efecto de estos en el crecimiento de las plantas de chile chilaca. En el Cuadro 7, se observa que la inoculación de Xcv tuvo un efecto marcado en la altura de la planta, número de hojas, área foliar y biomasa seca de raíz, además del efecto de los HMA que se han analizado anteriormente.

Cuadro 7. Efecto de los factores de estudio: HMA, *Xanthomonas* y bacteriófagos y sus interacciones en las variables de crecimiento en plantas de chile “chilaca”, 60 días después del trasplante.

Factores	Altura de	Diámetro	Número de	Área	Biomasa	Peso seco
			hojas			de raíz

	planta (cm)	de tallo (mm)		foliar (cm <sup>2</sup> )	seca de follaje	
<b>HMA</b>	0.6047	0.0026*	0.0296*	0.2650	0.1787	0.6389
<b>Xcv</b>	0.0054*	0.8130	0.0010*	0.0019*	0.1879	0.3171
<b>Fago</b>	0.1741	0.9207	0.3219	0.3119	0.1771	0.5531
<b>Interacciones</b>						
<b>HMA/Xcv</b>	0.2784	0.7398	0.5085	0.2575	0.8243	0.3160
<b>HMA/Fago</b>	0.0911	0.1123	0.3182	0.9321	0.4735	0.3966
<b>Fago/Xcv</b>	0.1004	0.1256	0.4471	0.8462	0.4681	0.9709
<b>HMA/Xcv/Fago</b>	0.2754	0.0000*	0.8153	0.2878	0.0079*	0.0004*

Números en celdas indican valores de probabilidad (P) de acuerdo al análisis de varianza\*, indica diferencias significativas, Anova ( $P \leq 0.05$ ).

La altura de la planta antes de ser inoculadas con Xcv tenían un promedio de 20.36 cm, 21 ddi las plantas inoculadas con Xcv presentaron una mayor altura de 40 cm en relación a las plantas que no fueron inoculadas con una altura de 36.39 cm (Fig. 27). En número de hojas y área foliar las plantas inoculadas con Xcv presentaron valores menores (11 hojas y 126.543 cm<sup>2</sup>) comparadas con las plantas sin la inoculación de Xcv (13 hojas y 148.755 cm<sup>2</sup>), estos últimos efectos del daño ocasionado por la mancha bacteriana en las plantas. Por último, hubo interacción entre los tres factores de estudio en diámetro del tallo, biomasa seca del follaje y de raíz.

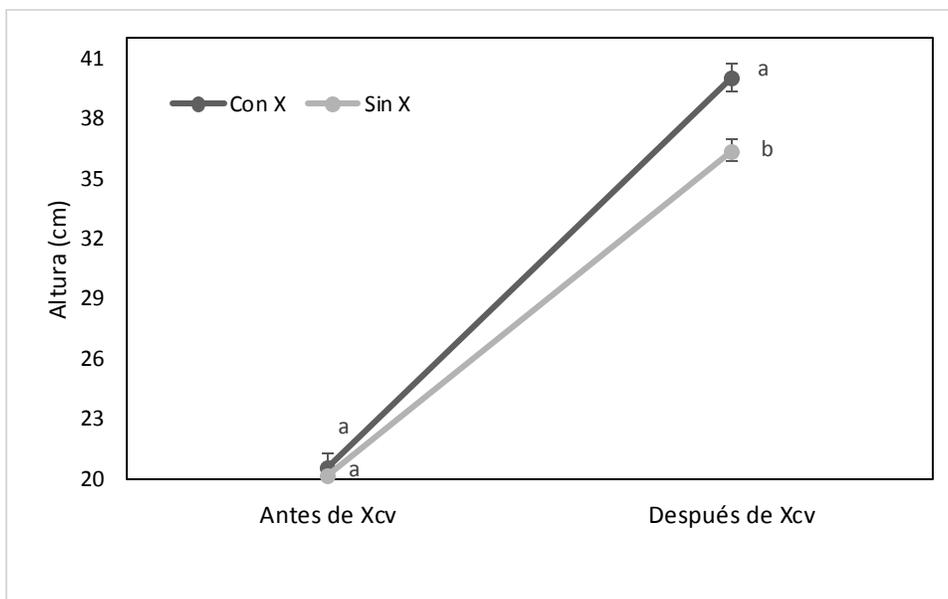


Figura 27. Altura de la planta antes de la infección de Xcv (39 días de crecimiento) y después de la inoculación (60 días de crecimiento y 21 días después de la inoculación), barras en los puntos indican el error estándar, letras distintas indican diferencias significativas Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Normalmente cuando las plantas son inoculadas con un patógeno, se espera que al verse afectado el sistema de la planta, detenga su crecimiento. Sin embargo, la respuesta de la planta ante el patógeno va a depender de la información genética de cada variedad. La planta mediante elicitores reconoce la bacteria fitopatógena (Gianinazzi, 2004). Este reconocimiento estimula la transcripción de ARN mensajero del hospedero, el cual codifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas (fenoles, alcaloides, sales inorgánicas, carbohidratos complejos, oligoglucanos, lípidos, ácidos grasos, péptidos, etileno, etc.) (Vivanco *et al.*, 2009), compuestos con diferentes actividades bioquímicas y biológicas, lo que da lugar a un sistema general de respuesta de las plantas con un carácter multifuncional, cuya principal función es reducir o inhibir el ataque o el rendimiento de sus enemigos. Las respuestas se producen tanto en el órgano de la planta atacada originalmente así como en el resto de la planta (García y Pérez, 2003). Lisón *et al.* (2013), reportaron que en plantas de tomate inoculadas con *Exocortis viroid* (CEVd), 20 días después de la inoculación las plantas presentan retraso del

crecimiento, además de los síntomas de la enfermedad, encontraron que las plantas infectadas sintetizaron proteínas relacionadas con la patogénesis (pathogenesis- related) como PR1, PR23, así como enzimas de defensa tales como endoquitinasa, glucanasa, entre otras. Castro *et al.* (2012) en plantas de chile CM-334 criollo, especie reportada como resistente a *Phytophthora capsici*, estudiaron la transcripción de genes relacionados a la síntesis de proteínas de defensa, encontraron que a ciertas dosis de *P. capsici* hay un incremento en las síntesis de PR-1, peroxidasas, glucanasas y EAS; respecto a plantas no enfermas. En otros trabajos se ha encontrado diferentes efectos en las plantas por la inoculación de agentes patógenos como por ejemplo Gutiérrez *et al.* (2016), en plantas de chilaca registro mayor biomasa seca después de la inoculación de *Phytophthora capsici* (PC), además de que las plantas no presentaron síntomas de la enfermedad, en otras variedades de chile (chile morrón, chile ancho, chile serrano var. camino real) las plantas infectadas con PC presentaron menor biomasa seca, además de los síntomas típicos de la enfermedad.

#### **6.3.4. 6 Evaluación de los hongos micorrízicos arbusculares y bacteriófagos en control del daño causado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en chile**

##### **6.3.4.6.1 Evaluación de los hongos micorrízicos arbusculares en el control de la mancha bacteriana**

En la comparación de medias del factor HMA (Cuadro 8), las plantas inoculadas con Ri fueron las que presentaron menor defoliación 2.125 promedio, respecto al testigo 4.098 promedio. En número de manchas en las plantas inoculadas con FM (48.571 promedio) fueron las que presentaron más en relación a las que fueron inoculadas con CAM 21.230 promedio, en área foliar dañada y hojas con manchas no se encontraron diferencias significativas.

Cuadro 8. Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares en la severidad de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile “Chilaca” en condiciones de invernadero.

Factor de estudio HMA	Defoliación	Hojas con manchas necróticas	Número de manchas necróticas por planta	Área foliar dañada enferma (cm <sup>2</sup> )
RI	2.125±0.426 <b>b</b>	5.375±0.757 <b>a</b>	39.785±8.841 <b>ab</b>	0.771±0.085 <b>a</b>
FM	3.517±0.567 <b>ab</b>	5.687±0.630 <b>a</b>	48.571±7.939 <b>a</b>	0.804±0.083 <b>a</b>
CAM	2.937±0.528 <b>ab</b>	4.437±0.427 <b>a</b>	21.230±4.244 <b>b</b>	0.701±0.071 <b>a</b>
<b>SIN HMA</b> <b>(Plantas enfermas)</b>	4.098±0.376 <b>a</b>	5.0±0.465 <b>a</b>	32.375±4.453 <b>ab</b>	0.902±0.108 <b>a</b>

Inóculos HMA: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas). Signos ± indican error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas, Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Como anteriormente se mencionó, el efecto de los HMA en las plantas va a depender de la compatibilidad funcional planta-HMA que va de acuerdo a las condiciones agroedafológicas en la que se establezca la simbiosis. Pozo *et al.* (2002), reportaron que *Funneliformis mosseae* tuvo efecto positivo en el control de *Phytophthora parasitica* en tomate, mientras que *Rhizophagus intraradices* (RI) no tuvo efecto en el control de la enfermedad. Galindo (2008), reportó el efecto bioprotector de Ri contra la mancha bacteriana en tomate. Fierro *et al.* (2013), reportaron a RI con efecto bioprotector contra *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate.

#### 6.3.4.6.2 Bacteriófagos en el control de la mancha bacteriana

En el análisis del factor bacteriófago contrario a lo que se esperaba no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 9), con la inoculación de este y sin la inoculación, en ninguna de las variables estudiadas.

Cuadro 9. Efecto de bacteriófagos en severidad de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en plantas de chile “Chilaca”.

<b>Factor bacteriófago</b>	<b>Defoliación</b>	<b>Hojas con manchas necróticas</b>	<b>Número de manchas necróticas por planta</b>	<b>Área foliar enferma (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>Con bacteriófago</b>	2.98661±0.372 a	5.267±0.387 a	35.034± 3.269 a	0.792±0.060 a
<b>Sin bacteriófago (plantas enfermas)</b>	3.35268±0.345 a	4.781±0.390 a	34.375± 2.966 a	0.795±0.063 a

Signos ± indican error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Respecto el efecto de los bacteriófagos, estos se pudieron aislar de los tejidos vegetales (fig. 31). Sin embargo, no tuvieron efecto en el control de la mancha bacteriana. El comportamiento de los bacteriófagos aplicados con alginato de sodio en contra de la mancha bacteriana en plantas de chile “chilaca” es poco claro, se puede atribuir a las condiciones ambientales que afectan la estabilidad del fago, además también se afecta el estado fisiológico de las bacterias y en consecuencia, la interacción huésped-virus y la efectividad de la capacidad del fago para reducir el número de bacterias (Fister *et al.*, 2016). El alginato de sodio puede sufrir despolimeración si se expone a temperaturas superiores a los 25°C (Avendaño *et al.*, 2013) en este experimento se registra temperaturas arriba de los 30°C, lo cual pudo afectar la persistencia del fago en la superficie de la hoja (Frampont *et al.*, 2012; Abedon, 2012; Balogh *et al.*, 2018) y para lograr el control de la enfermedad se debe mantener un título alto de fagos respecto a la bacteria blanco; a concentraciones por debajo, los fagos tendrán un impacto mínimo en el control de enfermedad (Frampont *et al.*, 2012).

En condiciones de invernadero los bacteriófagos están más expuestos a factores ambientales y otros factores que limitan su eficiencia en el control del daño de la enfermedad. De acuerdo a Balogh *et al.* (2018) los bacteriófagos se comportan diferente en la superficie de las hojas que *in vitro*, Gasic *et al.* (2016) informaron que el bacteriófago K  $\Phi$  1 fue más eficaz en el control de la mancha bacteriana de pimienta en la cámara de crecimiento (85%) en relación al control en invernadero (38%). La leche descremada ha sido utilizada también como formulación para protección de los fago con diferentes niveles de éxito en el control de enfermedades, sin embargo, Balogh *et al.* (2008), en condiciones de invernadero reportaron que a pesar de que la leche descremada ayuda la persistencia del fago en las hojas de cítricos, este no controló el cáncer de los cítricos causados por *Xanthomonas axonopodis*, al contrario aumenta el daño de la enfermedad, el modo de acción por el cual la leche descremada puede aumentar la severidad de la enfermedad no está claro, se cree que como actúa como agente humectante, rompe la tensión superficial y ayuda a la entrada del patógeno, además, puede servir como una fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria patógena.

#### **6.3.4.6.3 Efecto de bacteriófagos y HMA en la severidad de la mancha bacteriana en chile Chilaca en invernadero**

La combinación de la inoculación de Ri y bacteriófagos (RI.XB) fue el tratamiento más eficaz para controlar la gravedad de la mancha bacteriana. En todos los tratamientos en los que se inoculó el bacteriófago las plantas presentaron menor defoliación (Fig 29), en relación a los que no se le aplicó; sin embargo, estadísticamente no fue significativa. Las plantas donde no se aplicó *Xanthomonas* no hubo defoliación. En área foliar enferma (Fig. 29), las plantas del tratamiento con la inoculación con el consorcio Las Campesinas (CAM.X) fue el que tuvo menor área foliar enferma en relación a las plantas en la que únicamente se aplicó *Xanthomonas* (X). En número de manchas y número de hojas con manchas se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados.

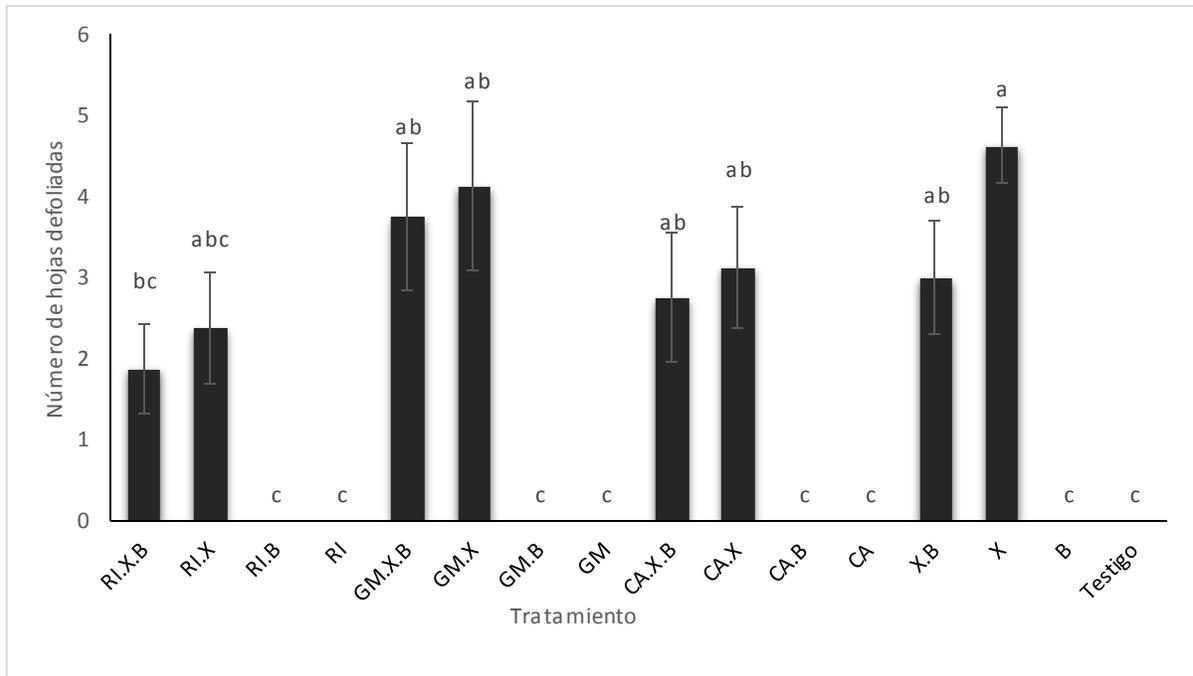


Figura 28. Efecto de la inoculación de HMA, bacteriofagos y su combinación en la defoliación provocada por Xcv, claves de tratamientos: Inoculos de HMA; *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (GM), Las Campesinas (CA), con Xcv; X, con bacteriófago; B. En plantas de Chile Chilaca en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas según Tukey ( $P \leq 0.05\%$ ).

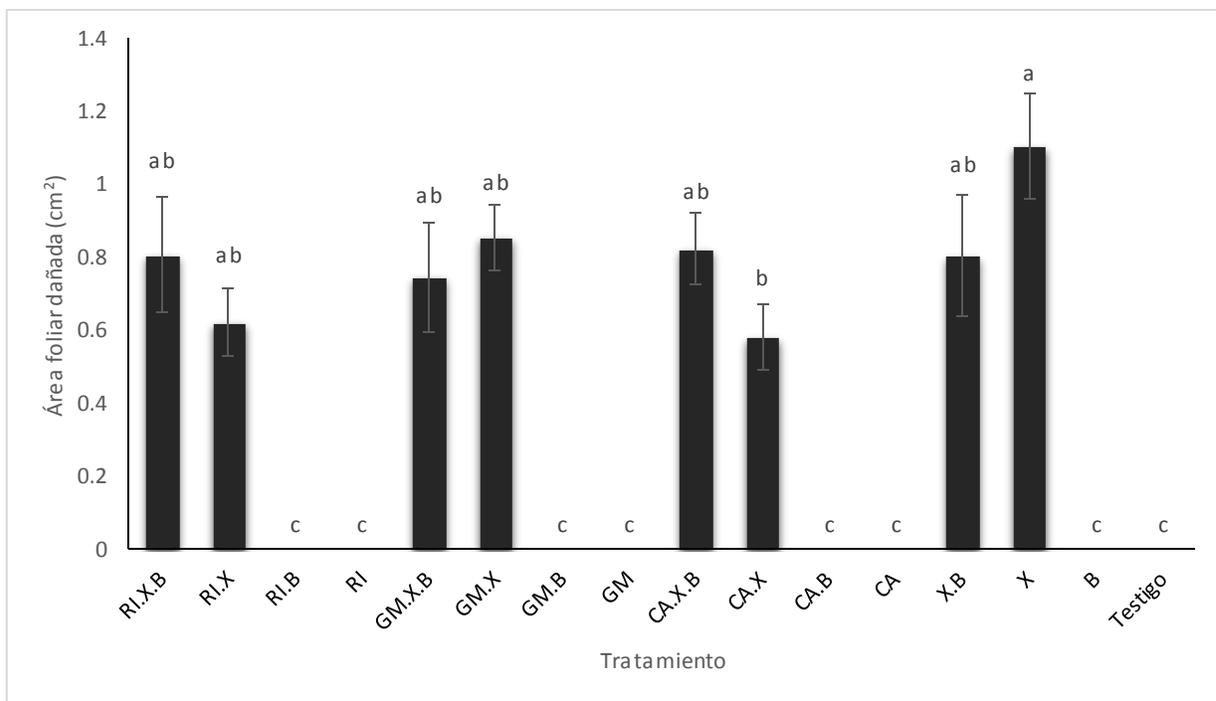


Figura 29. Efecto de la inoculación de HMA, bacteriofagos y su combinación en el área foliar enferma provocada por Xcv, claves de tratamientos: Inoculos de HMA; *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (GM), Las Campesinas (CA), con Xcv; X, con bacteriófago; B, en plantas de chile Chilaca en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar. Letras distintas para cada tratamiento indican diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey ( $P \leq 0.05\%$ ).

#### 6.3.4.6.4 Presencia de *X. campestris* pv. *vesicatoria* en tejidos enfermos

Al finalizar el experimento se re-aisló la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de tejidos enfermos de plantas de chile chilaca que presentaron las manchas típicas de esta enfermedad (Fig. 30), morfológicamente presentaron las mismas características y su consistencia mucoide.



Figura 30. Comparación de las cepas bacterianas de los tratamientos donde se inoculó a *Xanthomonas* con la cepa BV801. El número de la placa corresponde al tratamiento de donde se aisló la cepa, (801) corresponde a la cepa control (BV801).

Se verificó la presencia de BV801 en tejidos enfermos, al observar el crecimiento bacteriano en medio nutritivo, cumplieron con las características de color y consistencia típicas de la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatrix*.

#### **6.3.4.6.5 Presencia de bacteriófagos en los tejidos de las plantas**

En el ensayo doble placa en agar suave para ver la presencia o ausencia de los bacteriófagos XAF18 en los tejidos de las plantas en los que se inocularon (Fig. 31) se observó que en las diluciones correspondientes a tratamientos en donde no se inoculó *Xanthomonas* no se encontraron fagos. Mientras que en tratamientos donde se inoculó *Xanthomonas*, si se encontraron lisis de *Xanthomonas*

correspondientes a la presencia del fago XAF18. La estimación del título de fagos fue de 6,000 a 80,000 fagos por mL del macerado.

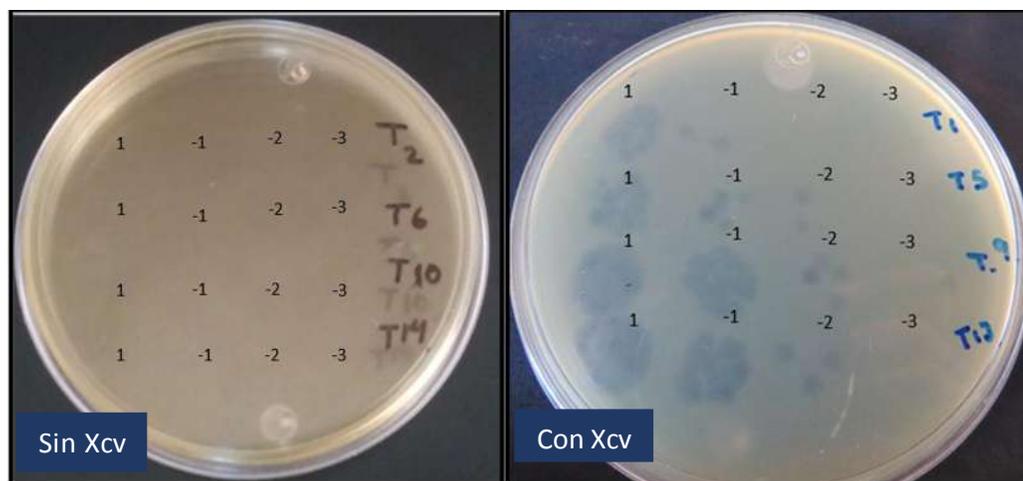


Figura 31. Detención de los bacteriófagos en el ensayo doble placa en agar suave para verificar la presencia o ausencia de estos virus en tejidos de la planta de los diferentes tratamientos. Sin Xcv indica los tratamientos donde no se inoculó *Xanthomonas* pero si se colocaron bacteriófagos; con Xcv, indica los tratamientos donde se inoculó *Xanthomonas* y sus bacteriófagos correspondientes. T: indica el tratamiento de origen; números indican la dilución decimal.

El no encontrar fagos en los tejidos de los tratamientos donde no se aplicó Xcv, es un fenómeno que ya ha sido reportado con anterioridad (Balogh *et al.*, 2004; Maura *et al.*, 2011). En referencia a los fagos que encontraron 21 días después de su inoculación en los tejidos de plantas de Chile "chilaca" e infectadas con la cepa BV801 de *Xanthomonas*, esto se debe a que el estar presente la bacteria blanco, los fagos puede replicarse y por lo tanto será mayor el tiempo que persista en la planta, ya que en varios experimentos el título de fagos desciende aún aplicado con formulaciones como por ejemplo con maíz pregelatinizado, leche descremada, casecrete, entre otros (Balogh *et al.*, 2003; Iriarte *et al.*, 2007).

### 6.3.4.6.6 Colonización de los HMA en plantas de chile “chilaca” y densidad de esporas

De acuerdo al análisis estadístico multifactorial para determinar el efecto de cada factor de estudio en las variables de porcentaje de colonización y densidad de esporas (cuadro 10). La densidad de esporas fue únicamente afectada por la inoculación de HMA, al analizar las interacciones se encontró que los HMA tuvieron interacción con la inoculación de Xcv y bacteriófagos. En cuanto al porcentaje de colonización, la inoculación de HMA fue el único factor que afectó la colonización micorrízica.

Cuadro 10. Efecto de los factores de estudio (HMA, Xanthomonas y bacteriófagos) y sus interacciones en las variables microbiológicas en plantas de chile “Chilaca” 60 días después del trasplante.

Factor	Densidad de esporas	Porcentaje de colonización
<b>HMA</b>	$p=0.000^*$	$p=0.000^*$
<b>Xcv</b>	$p=0.286$	$p= 0.710$
<b>Bacteriófago</b>	$p=0.209$	$p=0.588$
<b>Interacciones</b>		
<b>HMA/Xcv</b>	$p= 0.0012^*$	$p= 0.981$
<b>HMA/fago</b>	$p=0.0007^*$	$p=0.8801$
<b>Xcv/fago</b>	$p=0.1492$	$p=0.880$
<b>HMA/Xcv/fago</b>	$P=0.7014$	$p= 0.930$

HMA= Hongo micorrízico arbuscular, Xcv=*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*,  $p$ = valor de probabilidad asociada al estadístico del análisis de varianza multifactorial. \*Indica diferencias significativas a un nivel de confianza del 95%.

En el caso de la comparación de medias HMA (Tukey,  $p \leq 0.05$ ), se muestra en el cuadro 10, las diferencias estadísticas van en función del inóculo de HMA utilizado, y su adaptación a las condiciones en las que se establece la simbiosis micorrízica (Yıldiz, 2010; Azcón *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2009).

Cuadro 11. Comparación de medias de porcentaje de colonización y densidad de esporas de en plantas de chile “chilaca” a los 60 días después de la inoculación de diferentes inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis* (FM), consorcio “Las Campesinas” (CAM) y sin la inoculación de HMA (sin HMA).

Factor de estudio HMA	Colonización micorrízica	Densidad de esporas en 100 g de sustrato seco
<b>RI</b>	35.2242± 1.32 a	23.33± 2.842 a
<b>FM</b>	30.92± 1.52 b	16.38±1.94504 b
<b>CAM</b>	34.3708±0.98 a	26.66± 1.641 a
<b>Sin HMA</b>	0.00±0.00 c	0.0±0.00 c

Inóculos HMA: RI (*Rhizophagus intraradices*), FM (*Funneliformis mosseae*), CAM (consorcio Las Campesinas). Signos ± indican error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

En análisis de las interacciones de los niveles HMA y la inoculación de Xcv (Fig. 32) se observó diferencias estadísticas (Tukey,  $P \leq 0.05$ ), en plantas micorrizadas con *Rhizophagus intraradices*, en presencia de Xcv la densidad de esporas fue

mayor en relación en los sustratos de plantas donde no se inoculo Xcv donde se encontró menor densidad de esporas.

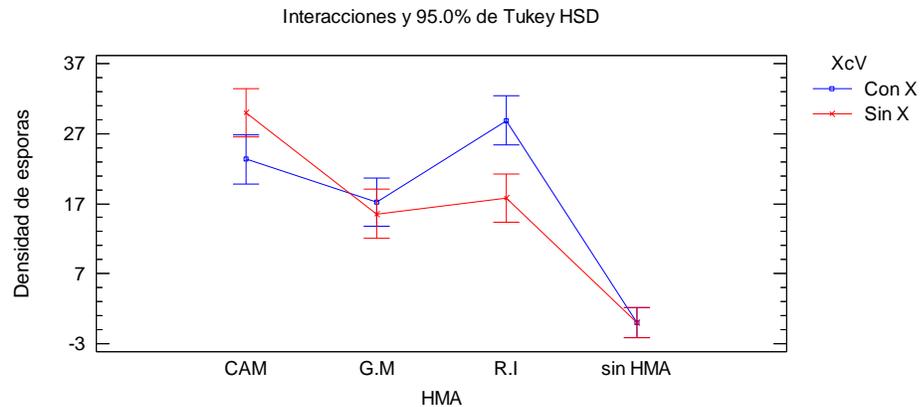


Figura 32. Comparación entre las Interacciones entre los niveles de hongos micorrízicos arbusculares y la inoculación de la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de acuerdo a Tukey, ( $P \leq 0.05$ ).

En la interacción de los niveles de HMA y la aplicación de bacteriófagos también se encontraron diferencias estadísticas de acuerdo a Tukey,  $P \leq 0.05$  (Fig.33). En plantas inoculadas con RI y la aplicación del fago la densidad de esporas fue mayor en relación a las plantas donde no se inoculo el fago. Caso contrario se presentó en sustratos de plantas inoculadas con Fm, en donde la presencia del fago disminuyó la densidad de esporas.

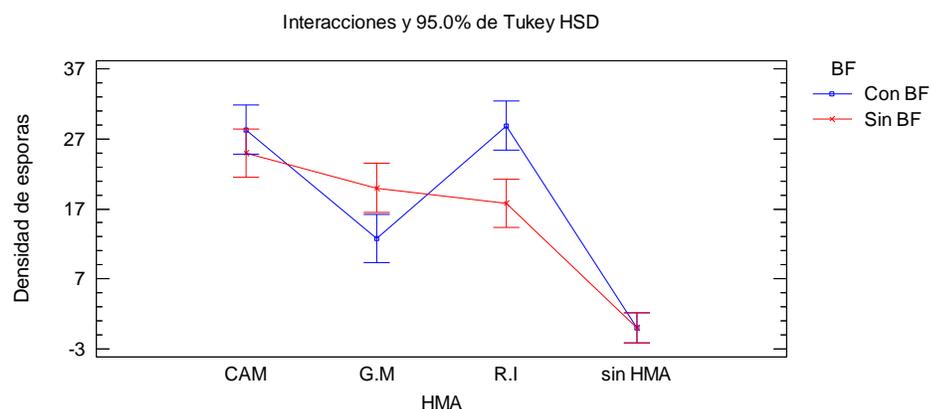


Figura 33. Comparación entre las interacciones entre los niveles de hongos micorrízicos arbusculares y la inoculación del bacteriófago XAF18 de acuerdo a Tukey, ( $P \leq 0.05$ ).

### Evaluación de las variables microbiológicas de los HMA por tratamiento

En el análisis estadístico del porcentaje de colonización (Fig. 32) en los diferentes tratamientos, no se encontraron diferencias (cuadro 11) entre las diferentes inoculaciones de HMA (Ri, Fm o CAM), mientras que en plantas donde no se inoculó HMA no se encontraron estructuras de los hongos micorrízicos arbusculares dentro de las raíces. En densidad de esporas (cuadro 10) los sustratos de las plantas en las que no se inoculó HMA no presentaron esporas en el sustrato y estadísticamente fueron difretes al resto de los tratamientos. Por otro lado, los tratamientos: inoculados con *Ri+Xanthomonas+bacteriofago* (Ri.X.B) y las inoculados con CAM+bacteriófago (CA.X) fueron los que presentaron mayor número de esporas en comparación a los tratamiento con Ri (Ri), con los tratamientos con Fm+Xcv+bacteriofago (FM.X.B) y, Fm+bacteriófago (FM.B) .

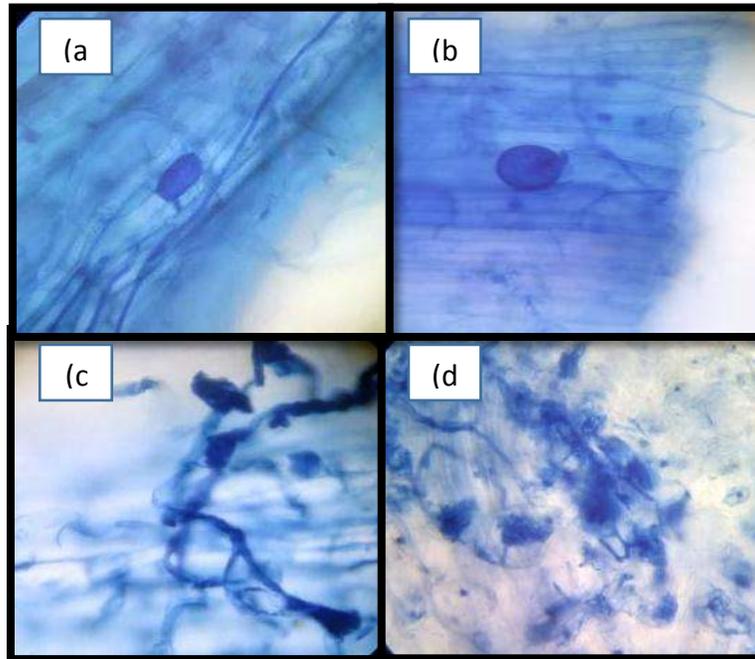


Figura 34. Estructuras fúngicas de los HMA dentro de las raíces de plantas de chile: (a) Vesicula, (b) espóra y (c y d) arbusculos. Vistas tomadas con aumento de 40x.

Cuadro 12. Efecto de HMA, *Xanthomonas* y bacteriófago en la densidad de esporas en el sustrato y colonización micorrizica en las raíces en plantas de chile “chilaca” a 60 días después de la inoculación de los HMA.

<i>Tratamiento</i>	<i>Núm. De esporas/ 100 g de sustrato</i>	<i>Porcentaje de colonización</i>
1. <i>RI.X.B</i>	32.222±4.006 <b>a</b>	36.076±3.135 <b>a</b>
2. <i>RI.X</i>	25.555±1.111 <b>abc</b>	34.446±3.394 <b>a</b>
3. <i>RI.B</i>	25.555±4.843 <b>abc</b>	36.296±2.893 <b>a</b>
4. <i>RI</i>	10±1.925 <b>de</b>	34.076±2.671 <b>a</b>
5. <i>FM.X.B</i>	12.222±1.111 <b>cde</b>	32.96±1.480 <b>a</b>

6. FM.X	22.222±4.444 <b>abcd</b>	30.003±2.940 <b>a</b>
7. FM.B	13.333±3.333 <b>bcde</b>	30.373±4.813 <b>a</b>
8. FM	17.777±4.444 <b>abcd</b>	30.373±3.758 <b>a</b>
9. CA.X.B	24.444±1.111 <b>abcd</b>	34.073±2.430 <b>a</b>
10. CA.X	22.221±4.844 <b>abcd</b>	35.186±0.982 <b>a</b>
11. CA.B	32.222±1.111 <b>a</b>	34.073±1.961 <b>a</b>
12. CA	27.777±2.222 <b>ab</b>	34.15±3.222 <b>a</b>
13. X.B	0±0.00 <b>e</b>	0±0.00 <b>b</b>
14. X	0±0.00 <b>e</b>	0±0.00 <b>b</b>
15. B	0±0.00 <b>e</b>	0±0.00 <b>b</b>
16. Testigo	0±0.00 <b>e</b>	0±0.00 <b>b</b>

Claves de tratamientos: Inoculos de HMA; *Rhizophagus intraradices* (RI), *Funneliformis mosseae* (GM), Las Campesinas (CA), con Xcv; X, con bacteriófago; B. Signos ± indican error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey al 95% de confianza ( $p \leq 0.05$ ).

No se observó una tendencia definida en el efecto de la interacción de los microorganismos en la respuesta densidad de esporas, es claro que el sistema de planta-HMA-*Xanthomona*-bacteriófago es complejo, y por lo tanto las respuestas de los diferentes tratamientos también lo son. En esta respuesta se debe considerar las diferentes especies de HMA que se utilizaron, la afinidad con la planta de chile chilaca y su comportamiento ante los diferentes factores (Garrido *et al.*, 2012, Yildiz *et al.*, 2010) como la presencia o ausencia de *Xanthomonas* o del bacteriófago, las condiciones climáticas y propiedades del sustrato en las que se desarrolla la micorrización.

La evaluación de bacteriófagos y hongos micorrízicos no se ha realizado con anterioridad, por lo que este es el primer trabajo de investigación en que se estudió la aplicación combinada de estos agentes en búsqueda de una estrategia sustentable para controlar los daños causados por la mancha bacteriana. Anteriormente se han estudiado la combinación de bacteriófagos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Balogh *et al.*, 2003), bacteriófagos con acibenzolar-s-metil un compuesto químico que estimula la resistencia sistémica adquirida de la planta (Obradovic *et al.*, 2005), ambas combinaciones mostraron tener mejor eficiencia en el control de la mancha bacteriana en tomate.

### **6.3.5 Conclusiones**

En este trabajo la inoculación con *Rhizophagus intraradices* presentó efecto en la disminución de defoliación en comparación a las plantas control (donde solo se inoculó Xcv). Los bacteriófagos no tuvieron efecto en control de la mancha bacteriana, sin embargo, en los tratamientos en los que se inoculó, se vió una disminución en la defoliación de la planta, aunque no fue estadísticamente significativa.

La combinación de Ri y bacteriófagos fue el tratamiento más eficaz para controlar el daño de la mancha bacteriana.

Se aislaron las cepas BV801 de tejidos enfermos, por lo que se confirmó que la enfermedad manifestada fue causada por inoculación de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Se recuperaron bacteriófagos únicamente de los tratamientos en los que se aplicó *Xanthomonas*.

### 6.3.6 Bibliografía

- Abedon, S. (2012). Bacterial "Immunity" against bacteriophages. *Landes bioscience* 2:50-54.
- Alarcón A; Davies F; Egilla J; Fox T; Estrada,L; y Ferrera, R. (2002). Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica papaya* L. under phosphorus stress. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44: 31-37.
- Araujo, R; Pereira, R; Ferreira M, Quezado, M; Café, A. (2012). Sensitivity of *Xanthomonas* causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and *in vivo* infra-specific competitive ability in *xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Revista Journal of Plant Pathology*, 79-87.
- Barrer, S. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 124 (7): 124-132.
- Balogh, B; Jones, J; Momol, M; Olson, S; Obradovic, A; King, P; y Jackson, L. (2003). Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. *Plant Disease*. 87:949-954
- Beltrán C; Quiñones A; Rincón E. (2014) Determinación del tiempo de micorrización en plántulas de papaya en vivero. *Sociedad mexicana de la ciencia del suelo. Suplemento especial 1*. 32(4):
- Castillo, R; Sotomayor, S; Ortiz, O; Leonelli, C; Borie, F; y Rubio, R. (2009). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on an ecological crop of chili peppers (*Capsicum annuum* L.). *Revista Chilena de Agrícola Investigación rural*. 69(1):79-87.
- Carrillo, M, Díaz F y Peña del Río, M. (2014). Productividad de tomate mediante micorriza arbuscular en agricultura protegida. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5 (3) 513-518.
- Carrillo, J; Sánchez, L; García R; Allende, R; y Márquez, I. (2001). Razas de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (Doidge) Dye. Presentes en el estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de fitopatología*. 19(2).
- Carrillo, J; García, R; Allende, R; Márquez, I; Millán O, y Gaxiola Espinoza, G; (2001). Sensibilidad a Cobre de Cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, en Sinaloa, México . *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19(1); 72-77
- Contreras, A y Aguilera, R; Arriaga, R; González A; Olalde, V; y Rivas; I. (2013) Influencia de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y desarrollo de *Capsicum annuum* L. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(1):77-88.

- Davies, J; Saraiva G, Carpio L; y Estrada, A. (2000) Colonization and Growth Effects of the Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* in a Commercial Nursery Container Production System. *Journal of Environmental Horticulture*: 18(4) 247-251.
- Díaz, A; Alvarado, M.; Ortiz, F. y Grageda, O. (2013). Nutrición de la planta y calidad de fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(2):315-321
- Galindo, F. (2008). Resistencia inducida por micorrizas en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) ante *Xanthomonas Campestris* ps. *Vesicatoria*. Instituto Politécnico nacional, México.
- García, R y Pérez, R. (2003). Fitoalexinas: Mecanismo de defensa de las plantas. Universidad autónoma de Chapingo. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 9(1); 5-10.
- Gaviria, A. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para E.coli DH5 $\alpha$  a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Córdoba*, 2852-2860.
- Gianinazi, S; Flanken, P; and Gianinazzi, V. (2004). Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of medicago truncatula-*Glomus musseae* interaction mycorrhiza, 14(4); 253-262.
- Guevara, B; y Estrella, M. (2008). Determinación y caracterización de enfermedades bacterianas del tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*), cultivado bajo invernadero en doce áreas de la cordillera central del Ecuador. Tesis, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Ecuador.
- Fernández, H; Rojas, M; Guevara, L; Rivas, D; Valadez, M y Zavaleta, M. (2014). Defensa en Chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematopica*. 42(1); 97-107.
- Hernández, H. (2012). Ficha técnica mancha bacteriana del tomate; bacterial leaf spot. Estado de México. Universidad autónoma Chapingo.
- Jones, J; Bouzar, H; Somodi, C; Stall, R; Pernezny, K; Morsy, G; y Scott W. (1998). Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas ampestris* sp. *Vesicatoria* in Florida. *Phytopathology*. 88 (1); 33-38.
- Jones, B; Lacy, G; Bouzar, H; Puesto, R y Schaad (2004). Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *System. Applied Microbiology*. 27; 755-762
- Jones, J; Jackson, L; Balogh, B; Obradovic, A; Iriarte, F; Momol, M (2007). Bacteriophage for plant disease control. *Phytopathology*. 45:245-62.

- Lee S; Go, Y; Bae, H; Park, J; Cho, S; Cho, H; Lee, D; Park, O; wang, M; Y Suh, C. (2009). Disruption of glycosylphosphati-dylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*. 150:42-54.
- Ley, R; Sánchez, J; Esther, R y Collazo, E. (2015). Efecto de cuatro especies de hongos micorrizógenos arbusculares en la producción de frutos de tomate. *Agronomía Costarricense*. 39(1): 47-59.
- López, M. (2016). Control biológico de la mancha bacteriana del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) mediante bacteriófagos. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco, A.C. México. 19-113.
- Maura, D., y Debarbieux, L. (2011). Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Applied Microbiology. Biotechnology*. 90(3); 851-859. doi: 10.1007 / s00253-011-3227-
- Manjarrez, M; Ferrera, R; González C. (1999). Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética de chile serrano. *Terra Latinoamericana*.
- Obradovic, A; Jones, J; Momol, M, Jackson, L; Balogh, B; Guven, T; Iriarte, F. (2005). Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*. 89:712-716.
- Pozo, M; Cordier, C; Dumas, E; Gianinazzi, J; Barea, J; Azcon, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*. 53(368): 525-534.
- Reyes, A; Quiñones E; Rincón, G; López, L; (2016). Micorrización en *Capsicum annuum* L. para promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7() 857-870.
- Rodríguez, L; y Arredondo, H. (2007). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303.
- Tafolla, A; González, A; Tiznado, M; Zacarías, L; Báez, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36(1).
- Trinidad, J; Quiñones, E; Hernández L; López, L; Rincón, G. (2017) Hongos micorrízicos arbusculares asociados a la rizosfera de *Agave cupreata* en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. *Scientia Fungorum*. 45:13-25.

- Trinidad, R; Quiñones, E; Rincón, G; López, L; Hernández, V; (2017). Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35() 151-169.
- Ritchie, D.F. 2000. Bacterial spot of pepper and tomato. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1027-01
- Scervino, M; Ponce, M; ERRA, B; Vierheilig, H; Ocampo, J; Y Godeas, J. (2005) Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Canadian Journal of Microbiology*. 53(6); 702-709.
- Solís, G; Quiñones, E y Rincón, G. (2016). Métodos de aislamiento y caracterización de bacteriófagos para el control biológico de bacterias fitopatógenas. In. *Manual básico de microbiología aplicada a la agricultura y al ambiente*. Ferrera, R; Alarcón., J; Almaraz y J. Delgadillo-Martínez (eds). Trillas, México.
- Stewart, L.; Hamel, C; Hegue, R; y Montoglis, P. (2005). Response of strawberry to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi under very high soil phosphorus conditions. *Mycorrhiza* 15:612-619.
- Kropinski A; Mazzocco A; Waddell T; Lingohr E; Johnson R. (2009) Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (eds) *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™*. 501. Humana Press.
- Vivanco, J; Cosio, E; Loyola, V; y Flores, H. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación Y Ciencia*. 341 (2); 68-75.

## 6.4 DISCUSIÓN GENERAL

La mancha bacteriana ocasionada por *Xanthomonas Campestris* pv. *vesicatoria*, es una enfermedad que representa uno de los principales problemas fitosanitarios en el cultivo del chile (*Capsicum annuum*. L.) (Shultz y French, 2011; Hernández, 2012). En la búsqueda de una estrategia biológica para controlar la mancha bacteriana en plantas de chile “Chilaca” se propone el uso de bacteriófagos, y su efecto sinérgico con diferentes inóculos de HMA, se considera las pruebas de patogenicidad como un aspecto clave para la validación y estandarización de la metodología a utilizar en experimentos más complejos. En estudios predecesores a esta investigación se reportan diferentes técnicas de inoculación, con diferentes cepas de *Xanthomonas*, utilizadas en diferentes variedades de chile y jitomate (Galindo, 2008; López, 2016; Cruz *et al.*, 2001). Los resultados mostrados en el primer capítulo permitieron estandarizar un método de inoculación de la cepa BV801 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en las plantas de chile “Chilaca”. Considerando la defoliación que provocó el método mediante la aspersión haz-envés preparada a partir del crecimiento bacteriano en fase estacionaria en el medio, a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> fue el más eficiente para infectar las plantas, al provocar 75% de defoliación en las plantas. Lo cual concuerda con la técnica utilizada por Jones *et al.* (2007), López (2016), Balogh *et al.* (2018).

Por otra parte, se buscó estandarizar una manera de cuantificación del daño de la enfermedad mediante la generación de una escala cualitativa ordinaria de daño. Al tratarse de una enfermedad de manchas foliares, las lesiones de la mancha bacteriana a menudo se unen, presentan diferentes tamaños y coloración, las hojas pueden presentar clorosis (Ritchie, 1995; Galindo 2008). La información mostrada en el segundo capítulo de este trabajo reveló que la manifestación de los síntomas ocurren de acuerdo a las condiciones ambientales en las que se encuentren las plantas post-inoculación, lo cual concuerda con Vidaver *et al.* (2004). En este apartado se muestran síntomas de la enfermedad los brotes tiernos presentaron una apariencia translúcida que denotaba la maceración interna

de los tejidos de la hojas en ambientes de alta humedad por largos periodos de tiempo, que no han sido reportados en la literatura. Se generaron dos escalas ordinarias cualitativas de daño. Pero al final ninguna de las dos pudo ser utilizada en el experimento final, debido a que las condiciones ambientales cambiaron y por ende los síntomas de la enfermedad se manifestaron de diferente manera.

Retomando la hipótesis principal de este trabajo de investigación, los HMA son simbiontes obligados de las plantas, esta asociación proporciona beneficios para ambos, en las plantas se ve reflejado en mayor crecimiento y desarrollo de la planta. Además, que también ayuda en el control de diversos fitopatógenos, y a cambio los HMA toman los carbohidratos necesarios para cumplir su ciclo biológico (Azcón *et al.*, 2002). En la evaluación de los HMA como promotores de crecimiento en plantas de chile “chilaca”, en experimento evaluado a los 173 días después de la inoculación con HMA (ddi), los inóculos; *Rhizophagus intraradices* (Ri), *Funneliformis mosseae* (Fm) y el consorcio Las campesinas (CAM) tuvieron un efecto positivo en la formación de órganos reproductivos en relación a las plantas sin HMA, además las plantas inoculas con CAM presentaron mayor diámetro de tallo, biomasa seca de follaje y raíz, en relación a las plantas sin HMA. En un segundo experimento evaluado a los 60 ddi se encontró que únicamente el inóculo Ri promovió la generación de hojas en plantas en relación a los tratamientos sin HMA y Fm presentó menor diámetro del tallo en comparación a los demás tratamientos (Ri, CAM y Sin HMA). En cuanto a la colonización micorrízica, esta no estuvo relacionada en la promoción de crecimiento, en el primer experimento Fm presento mayor colonización micorrízica en comparación a Ri y CAM, sin embargo no mostró tener alguna ventaja en promoción de crecimiento de las plantas de chile “chilaca”, en el segundo experimento los porcentajes de colonización fueron más bajos en comparación al primero esto relacionado a que la colonización micorrízica se establece de manera paulatina (Beltrán *et al.*, 2014); Fm presentó el porcentaje de colonización más bajo en relación a Ri y CAM. Estos resultados concuerda con Tapia *at al.* (2010), donde señalan que hay inóculos de HMA con bajo porcentaje (15-40%) de colonización y tienen un excelente efecto en la promoción del crecimiento de las plantas, Reyes

*et al.* (2016) en su trabajo también muestra resultados similares donde no hay relación entre el porcentaje de colonización y la promoción de crecimiento.

Ahora bien, en la evaluación de los HMA en el control del daño de mancha bacteriana se encontró que RI tuvo efecto en la disminución de la defoliación de las plantas en relación de las plantas sin HMA y en el caso CAM tuvo efecto en la disminución del número de manchas en las hojas. Como anteriormente se mostró con las inoculaciones de HMA, en los tres casos (Ri, Fm y CAM) se observaron las raíces colonizadas. En este caso se observó el efecto de Ri en la promoción de crecimiento y su efecto como bioprotector ante la mancha bacteriana en las plantas de Chile "Chilaca", y en el caso de CAM solo su efecto bioprotector. Existe un amplio rango de anfitriones-hospedantes, por lo que los efectos de la simbiosis son engañosos, ya que hay un nivel funcional-compatibilidad, demostrada por las simbiosis entre diferentes aislados de HMA y diferentes especies de plantas que varían en compatibilidad, además la funcional compatibilidad también se ve afectada por las condiciones climáticas y de suelo (Harrier y Watson, 2004; Yildiz 2010).

Por otro lado, los bacteriófagos, virus específicos de bacterias, son agentes de control biológico, introducidos desde la década de 1990 para el control de la mancha bacteriana (Balogh *et al.*, 2002). En este trabajo los fagos se aplicaron 24 h después de la inoculación de Xcv, en microencapsulación en alginato al 3%, los datos mostraron que no hubo efecto en el control de la mancha bacteriana a pesar de que se encontraron bacteriófagos en los tejidos de las plantas enfermas 21 días después de su inoculación. Este resultado difiere con lo que se esperaba encontrar. Es confuso entender este fenómeno, se puede atribuir a las condiciones ambientales que pudieron afectar la estabilidad del fago, además también se afectan el estado fisiológico de las bacterias y en consecuencia, la interacción huésped-virus y la efectividad de la capacidad del fago para reducir el número de bacterias (Fister *et al.*, 2016) A pesar que se han utilizado diferentes formulaciones para mejorar la persistencia del fago en la filósfera, sin embargo los rayos UV y altas temperaturas siguen siendo el principal factor limitante en el desarrollo de

tratamientos eficientes con bacteriófagos (Frampont *et al.*, 2012; Abedon *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2012, Balogh *et al.*, 2018).

Una de las características de los bacteriófagos es su alta especificidad a un grupo de bacterias en particular, no son tóxicos, (Balogh *et al.*, 2003) dicha característica permite la aplicación con agentes de control como lo hongos micorrízicos arbusculares. Se encontró que la combinación de bacteriófagos y la micorrización de la plantas con *Rhizophagus intraradices* redujeron la defoliación en relación a las plantas sin tratamiento, la colonización micorrízica no se afectó por la inoculación de Xcv o el bacteriófago. La densidad de esporas del inoculo *Rhizophagus intraradices* aumento por la presencia Xcv y el fago, en *Funneliformis mosseae* con la aplicación de bacteriófago se encontró menor densidad de esporas.

Los resultados de esta tesis indicaron que si hubo un efecto sinérgico en la combinación de *Rhizophagus intraradices* y bacteriófagos en la promoción del crecimiento y en la disminución de la defoliación de las plantas enfermas por la mancha bacteriana, por lo que se comprueba la hipótesis de este trabajo de investigación. Este es el primer trabajo de investigación que evaluó la combinación de estos agentes de control biológico contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Los resultados de este trabajo son relevantes y con potencial en la búsqueda de una estrategia sustentable para el control de la mancha bacteriana del cultivo de Chile.

## 6.5. CONCLUSIÓN GENERAL

Los HMA tuvieron efecto en promoción del crecimientos, además, *Rhizophagus intradices* y el consorcio Las Campesina mostraron tener efecto en la disminución del daño de la enfermedad. Por otro lado, los bacteriófagos no mostraron tener un efecto significativo en el control de la mancha bacteriana. Finalmente la aplicación de bacteriófagos y *Rhizophagus intraradices* en plantas de chile “Chilaca” disminuyeron el daño causado por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* por lo que se consideran como herramienta con potencial para considerar en estrategias sustentables en el control de la mancha bacteriana en el cultivo de chile.

## 6.6. RECOMENDACIONES

Ante los resultados encontrados en este trabajo, la aplicación combinada de bacteriófagos y hongos micorrízicos son una herramienta con potencial para el desarrollo de estrategias de manejo dentro de un agricultura sustentable. Sin embargo, hace falta evaluar diferentes formulaciones para proteger los bacteriófagos, también evaluar la frecuencia de aplicaciones en condiciones ambientales que se asemejen a las condiciones de campo donde se cultiva el chile, cada uno de los factores estudiados interactúan diferente ante múltiples factores bióticos y abióticos, lo que afecta directamente el biocontrol de la enfermedad.

Resulta importante avaluar estos microorganismos con la aplicación de otros microorganismos o compuestos químicos que estimulan las defensas de las plantas y que tienen un enfoque prometedor para el control integral y eficiente de la enfermedad.

## VII BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

- Abedon, S. (2012). Bacterial "Immunity" against bacteriophages. *Landes bioscience* 2; 50-54.
- Aguilar, V; Corona, T; López L; Latournerie, M; Ramírez, M; Villalón M; Y Aguilar, C. (2010). Los chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Libro. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114.
- Alarcón A; Davies F; Egilla J; Fox T; Estrada, L; y Ferrera, R. (2002). Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica papaya* L. under phosphorus stress. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 44: 31-37.
- Araujo, R; Pereira, R; Ferreira M, Quezado, M; Café, A. (2012). Sensitivity of *Xanthomonas* causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and *in vivo* infra-specific competitive ability in *xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. *Revista Journal of Plant Pathology*, 79-87.
- Badii, M. (2006). Control biológico una forma sustentable del control de plagas y enfermedades. *Revista International Journal of good conscience*. 1 (1): 82-89.
- Bago, B; Pfeffer y Shachar-Hill. (2000). Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant physiology*. 124: 949-957.
- Barrer, S. (2009). El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 124 (7); 124-132.
- Camarena, G; (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18(3); 409-421.
- Correón, Y; Gómez, N; y Martínez, M. (2008). Las micorrizas arbusculares en la protección vegetal. *Revista Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*. (10); 60-70.
- Colom, J; Cano, S; Otero, J, Aríñez, S, Cortés, J; Maspoch, D y Llagostera, M. (2017). Microencapsulation with alginate/ CaCO<sub>3</sub>: A strategy for improved phage therap. *Scientific RepoRts*. 7(4):14-41.
- Cordier, M; Pozo, J; Barea, S; Gianinazzi, y Gianinazzi-Pearson. (1998). Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. Granada, España. CSIC.

- Conejero, V; Bellés J; García, F; Garro, R; Hernández, Y; Rodrigo, I, y Vera, P. (1990). Signalling in viroid pathogenesis. RSS Fraser (ed). in: Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. Springer Verlag, Berlin, 233-261.
- Cruz, J. (Ed.). (2001). Chile habanero: Características y tecnología de producción. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 9-17.
- Cruz, S; Ramírez, R; Tlapal, B; Ramírez, I; García, R; Sandoval J y Castillo, F. (2001) producción masiva de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. Agrociencia. 35: 575-58.
- FAOSTAD. (2017). Módulo de producción. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/#data/QC/visualize>.
- García, J; Tehuacatl X.; y Vázquez, R. (2009). Manchas Bacterina; en Manual de producción de tomate en Invernadero. Catellanos (2009). Intagri, S.C. Celaya, Guanajuato. 412- 418.
- Gary, E; Vallad, M y Robert, M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agricultura. Crop Sci. 44; 1920–1934.
- Gómez, M; y Vives, M. (2009). Bacteriófagos: virus de bacterias que curan infecciones. Apuntes científicos uniandinos. 1(10).
- Hartman G; Pawlowski, M; Chan, H; Colina, C. (2016). Successful Technologies and Approaches Used to Develop and Manage Resistance against Crop Diseases and Pests. Emerging Technologies for Promoting Food Security. 43-66
- Harris, Citlalli; Esqueda, M; Valenzuela, Elisa; Castellano, E., (2009). Tolerancia al estrés hídrico en la interacción planta-hongo micorrízico arbuscular: metabolismo energético y fisiología. Revista Fitotecnia Mexicana. 32(4); 27-65.
- Harrier, L y Watson, C. (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. Pest Management Science. 60 (2): 149-57
- Heil, M y Bostock, R. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. Annals of botany. 89: 503-512.
- INIFAP (2010). Fertirrigación de Chile serrano con riego por goteo en el sur de Tamaulipas. Libro Técnico. INIFAP.
- Iriarte, F; Balogh, F; Momol, B; Smith, M; Wilson, M; y Jones, B. (2007). Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surface. Applied and environmental microbiology. 73(6); 1704-1711.

- Jaramillo, S; Silva, J; Osorio, W. (2004). Potencial simbiótico y efectividad de hongos micorrizo arbusculares de tres suelos sometidos a diferentes usos. Rev. Fac. Nac. Agronomica. Medellín. 57(1); 2203-2214.
- Jones, J; Vallad, G; Iriarte, F; Obradovic, A; Wernsing, H; Jackson, L; Balogh, B; Hong, H; y Momol, T. (2012). Considerations for using bacteriophages for plant disease control. Bacteriophage. 2(4); 208-214.
- Karandashov, V and Bucher, M. (2005). Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. Trends in Plant Science. 10 (1); 22-28.
- Kuchare, T. (1994). Plant pathology fact sheet: Bacteria spot of tomato and pepper. University of Florida, Institute of food and Agricultural Sciences. Plant Pathology Department Cooperative.
- Madriz, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas. 63(1); 22-32.
- Maura, D., y Debarbieux, L. (2011). Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine a. Applied Microbiology Biotechnology. 90(3); 851-859.
- Manjarrez, M; Ferrera, R; González C. (1999). Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética de chile serrano. Terra Latinoamericana.
- Mendoza, R. (2015). Uso de bacteriófagos como agentes de control biológico del tizón de halo de frijol causado por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara. México, 12-78.
- Monteiro, L; Ramos, R, y Souto-Maior. (2005). Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. Universidad. Federal de Pernambuco. 48(1); 23-29.
- Lara, L. (2015). Obtención de un coctel de bacteriófagos líticos para el control de bacteriosis en cultivos de tomate (*solanum lycopersicum*) del cantón ambato, provincia de Tungurahua. Tesis de licenciatura. Universidad de las fuerzas armadas. Ecuador, 12-90.
- Ley, R; Sánchez, J; Esther, R y Collazo, E. (2015). Efecto de cuatro especies de hongos micorrizógenos arbusculares en la producción de frutos de tomate. Agronomía Costarricense 39(1); 47-59.
- Liu, L; Kloepper, J; Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth promoting rhizobacteria: Duration of protection end effect of host resistance on protection and root colonization. Phytopathology 85(10);1064-1068.

- Liu, J; Maldonado, I; Lopez, M; Cheung, F; Town, C; Harrison, M. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* 50 (3):529-544.
- López, M. (2016). Control biológico de la mancha bacteriana del cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) mediante bacteriófagos. Tesis de maestría. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño del estado de Jalisco, A.C. México. 19-113.
- Jones, B; Lacy, G; Bouzar, H; Puesto, R y Schaad (2004). Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and papper. *System. Applied Microbiology.* 27:755–762
- Obradovic, A; Jones, J; Momol, M; Olson, S; Jackson, L; Balogh, B; Iriarte, F. (2005). Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*, 89(7), 712–716.
- Pozo, M; Cordier, C; Dumas, E; Gianinazzi, J; Barea, J; Azcon, C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany.* 53(368): 525-534.
- Quezado-D; Gazzoto, A.; Leite, R; Camargo, L. (2003). Sensibilidade a cobre, estreptomycin e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira*, Brasília. 21(4); 670-675.
- Quiñones, E; Hernández, E; Rincón, G; Ferrera, R. (2012). Interacción de hongos micorrizicos arbusculares y fertilización fosfatada en papaya. *Terra latinoamericana.* 30(2); 165-176.
- Quiñones, E; Ochoa, A; Solís, G y Rincón, G. (2014). Biotecnología en las enfermedades de las bacterias. *La Ciencia Y el Hombre.* 27(3);53-58
- Pérez, E. (2010). Hongos micorrizicos arbusculares (HMA) para la bioprotección de patógenos en el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Instituto nacional de ciencias agrícolas. La Habana, Cuba.
- Ramírez, M y Rodríguez, A. (2010). Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria.*
- Ramírez, M y Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrizica: Una revisión. *Revista Colombiana de biotecnología.* 14(1):271:284.

- Reyes, A; Quiñones E; Rincón, G; López, L; (2016). Micorrización en *Capsicum annuum* L. para promoción de crecimiento y bioprotección contra *Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 7() 857-870.
- Requena, N; Serrano, E; Ocón, A; Breuninger, M. (2006). Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. Elsevier. Doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.036. Vol.68 33-40.
- Ritchie, D.F. 2000. Bacterial spot of pepper and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1027-07.
- Rodríguez, L; y Arredondo, H. (2007). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303.
- Smith, S Y Read, D. (2008). Mycorrhizal symbiosis. 3<sup>rd</sup>. Academic Press, London, United Kingdom.
- SAGARPA (2017). Cierre de producción agrícola. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/)
- Sarabia, M; Madrigal, R, Martínez, M, y Carreón, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Universidad de San Nicolás de Hidalgo. 12:1.
- Segundo, N; Hernández, B; López, O; Torres, O. (2010). Los bacteriófagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas Bacterianas (Fagoterapia). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 41(3) 17-26.
- Silva, S. (2012). Efecto de bacteriófagos expresando moléculas en contra de *xylella fastidiosa* en dos variedades de vid: Cabernet sauvignon y Red globe. Tesis Maestría. Universidad autónoma de Baja California. México. 12.
- Schneider, M; Meuwly, P; Metraux, P. (1996). Systemic Acquired Resistance in plants. Institute de Biologie VCgCtale, University de Fribourg. Conrath.
- Solís, G; Quiñones, E y Rincón, G. (2016). Métodos de aislamiento y caracterización de bacteriófagos para el control biológico de bacterias fitopatógenas. In. Manual básico de microbiología aplicada a la agricultura y al ambiente. Ferrera, R; Alarcón., J; Almaraz y J. Delgadillo-Martínez (eds). Trillas, México.
- Tafolla, A; González, A; Tiznado, M; Zacarías, L; Báez, R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 36(1).
- Trinidad, J; Quiñones, E; Hernández L; López, L; Rincón, G. (2017) Hongos micorrízicos arbusculares asociados a la rizosfera de *Agave cupreata* en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. Scientia Fungorum. 45:13-25.

- Trinidad, R; Quiñones, E; Rincón, G; López, L; Hernández, V; (2017). Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35():151-169.
- Kropinski A; Mazzocco A; Waddell T; Lingohr E; Johnson R. (2009) Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. In: Clokie M.R., Kropinski A.M. (eds) *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology™*. 501. Humana Press.

## VIII ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo NYGA (peptona, extracto de levadura, agar, glicerol y agua) para crecimiento de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Componente	Cantidad para preparar 1 L
Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glicerol (99%)	20 mL
Agar	10 g
Agua	Aforara 1000 mL

Anexo 2. Medio de cultivo NYGA-suave para crecimiento de *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Componente	Cantidad para preparar 1 L
Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glicerol (99%)	20 mL
Agar	7 g
Agua	Aforara 1000 mL

Anexo 3. Medio de cultivo NYG (líquido) para crecimiento de *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Componente	Cantidad para preparar 1 L
PEPTONA	5 g
EXTRACTO DE LEVADURA	3 g
GLICEROL (99%)	20 mL

AGUA	Aforara 1000 mL
------	-----------------

Anexo 4. Buffer de fosfatos para preparar el inóculo bacteriano de la cepa BV801 de *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Componente	Cantidad para preparar 1 L
$K_2HPO_4$	61.5 mL
$KHPO_4$	38.5 mL
Agua destilada estéril	Aforara 1000 mL

Anexo 5. Preparación del alginato de sodio al 3% para encapsular a los bacteriófagos.

Componente	Cantidad para preparar 1 L
Alginato de sodio	30 g
Agua destilada estéril	Aforara 1000 mL

Anexo 6. Preparación de cloruro de calcio 0.5 M para preparar el encapsulamiento de bacteriófagos.

Componente	Cantidad para preparar 1 L
Cloruro de calcio	73.5 g
Agua destilada estéril	Aforara 1000 mL

Anexo 7. Solución de formol, ácido acético y alcohol (FAA) para conservación de las raíces.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para preparar 1L</b>
<b>Formol (38.5%)</b>	100 mL
<b>Ácido acético (100%)</b>	50 mL
<b>Alcohol (96%)</b>	500 mL
<b>Agua</b>	350 mL

Anexo 8. Solución de ácido clorhídrico (HCL 0.1 N).

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para preparar 1L</b>
<b>Ácido clorhídrico al (37%)</b>	8 mL
<b>Agua destilada</b>	Aforara 1000 mL

Anexo 9. Solución de hidróxido de potasio al 10%.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para preparar 1 L</b>
<b>Hidróxido de potasio</b>	100 g
<b>Agua destilada</b>	Aforara 1000 mL

Anexo 10. Solución de lactoglicerol.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para preparar 1 L</b>
<b>Ácido láctico (85%)</b>	250 mL
<b>Glicerina (99%)</b>	500 mL
<b>Agua destilada</b>	250 mL

## Anexo 11. Extracción de ADN para bacterias Gran Negativas mediante el Kit Promega

- Tomar un 1mL del cultivo bacteriano de 24 h en crecimiento.
- Vaciar en un tubo eppendor de 1.5 mL
- Centrifugar de 13 000 a 16 000 X g por dos minutos para formar un pellet, retirar el sobrenadante
- Agregar 600 µl de la solución lisis nucleica, pipetear cuidadosamente para resuspender el pellet bacteriano.
- Inocular a 80°C por 5 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente, agregar 300 µl de la solución de ARNasa, Invertir dos a tres veces para mezclar.
- Inocular a 37°C de 30 a 45 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 200 µl de solución de precipitación de proteína. Mezclar vigorosamente.
- Enfriar a 5°C por 5 minutos.
- Centrifugar de 13 000 a 16 000 X g por 3 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendor, agregar 600 µl de isopropanol y mezclar por inversión.
- Centrifugar a 13000-16000 X g por 2 minutos, retirar el sobrenadante y agregar 600 µl de etanol a 70% y mezclar cuidadosamente.
- Retirar el alcohol y dejar secar de 10 a 15 minutos.
- Agregar 100 µl de solución de rehidratación de ADN y dejar a 65°C por 1h.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Anexo 12. Soluciones madre recomendada para la formulación de las soluciones nutritivas Solución nutritiva (Hoagland y Arno)

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ,	1 Molar (236 g L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1 Molar (101 g L <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub>	1 Molar (246.5 g L <sup>-1</sup> )
KH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	1 Molar (136 g L <sup>-1</sup> )
Quelato de Fe	500 ppm de Fe
<b>Micronutrientes</b>	
NaNO <sub>3</sub>	1 Molar (85.01 g L <sup>-1</sup> )
MgCl <sub>2</sub>	1 Molar (95.23 g L <sup>-1</sup> )
NaSO <sub>4</sub>	1 Molar (142.06 g L <sup>-1</sup> )
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1 Molar (138.01 g L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub>	1 Molar (110.99 g L <sup>-1</sup> )
KCl	1 Molar (74.55 g L <sup>-1</sup> )

Anexo 13. Comprobantes académicos de la presentación de trabajos en eventos académicos.

The certificate is presented on a white background with a blue header and a large blue central area containing the main text. At the top left, there are logos for CONACYT (CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS) and the Mexican coat of arms. To the right of these are the logos for IIAF (Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales) and the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Below the logos, the text reads: 'Otorgan la presente CONSTANCIA'. The central blue area contains the following text: 'A: Susana Bautista Villegas, Luis López Pérez, Gabriel Rincón Enriquez, Nuria Gómez Dorantes, Cristian Marc Philippe Lobit y Evangelina E. Quiñones Aguilar. Por su presentación titulada: Efecto de hongos micorrizales arbusculares y bacteriofagos contra la mancha bacteriana en chíle "chilaca". en el "Seminario del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria 2018" celebrado el día 23 de octubre en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.' At the bottom, there are three signatures and their corresponding titles: 'Dra. Melba Ramírez González, Coordinadora del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria'; 'Dr. Samuel Pineda Guillermo, Director del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales'; and 'Dr. Mauricio Perea Peña, Secretario Académico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.'

CONACYT  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



IIAF  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales  
Programa de Maestría en Producción Agropecuaria

Otorgan la presente

# CONSTANCIA

A: Susana Bautista Villegas, Luis López Pérez, Gabriel Rincón Enriquez, Nuria Gómez Dorantes, Cristian Marc Philippe Lobit y Evangelina E. Quiñones Aguilar.  
Por su presentación titulada:  
*Efecto de hongos micorrizales arbusculares y bacteriofagos contra la mancha bacteriana en chíle "chilaca".*  
en el "Seminario del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria 2018"  
celebrado el día 23 de octubre en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales.

Dra. Melba Ramírez González  
Coordinadora del Programa de Maestría en Producción Agropecuaria

Dr. Samuel Pineda Guillermo  
Director del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Dr. Mauricio Perea Peña  
Secretario Académico del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

## **Efecto de hongos micorrízicos arbusculares y bacteriófagos contra la mancha bacteriana en chile “chilaca”**

Susana Bautista Villegas<sup>1\*</sup>, Gabriel Rincón Enríquez<sup>2</sup>, Nuria Gómez Dorantes<sup>1</sup>, Philippe Lobit<sup>1</sup>, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar<sup>2</sup>, Luis López Pérez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México;

<sup>2</sup> Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México.

\*Autor para correspondencia: subavi28@gmail.com

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), bacteriófagos, y su combinación contra *Xanthomona campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) en plantas de chile. En invernadero primero se realizó un ensayo de patogenicidad para determinar que concentración y modo de aplicación del patógeno y generar una escala ordinal cualitativa del daño. Posteriormente se estableció un ensayo donde se evaluaron cuatro niveles micorrización (*Rhizophagus Intraradices* (RI) *Funneliformis mosseae* (FM), un consorcio “Campesinas” (CAM) y sin HMA, donde se evaluó variables morfológicas en plantas. Finalmente se estableció un ensayo donde se evaluará la interacción entre HMA, Xcv y bacteriófago sobre plantas de chile. Los resultados del primer ensayo mostraron que la dosis que provocó síntomas de enfermedad fue  $2.0 \times 10^{-7}$  ml UFC, aplicado por aspersión al haz y envés en la tercera hoja y se generó una escala con seis niveles de daño. Del segundo ensayo se encontró que el crecimiento de las plantas y su colonización micorrízica, dependiendo del HMA inoculado. Plantas de chile inoculadas con el HMA CAM, mostraron un mayor tamaño de planta así como, un mayor número de órganos reproductivos respecto a las plantas sin HMA. Estas plantas presentaron además un 41% de colonización micorrízica. El tercer ensayo se encuentra en etapa de crecimiento vegetativo ya se inoculó la bacteria Xcv y aplicó el bacteriófago. A los 60 días de establecido, se realizará un muestreo destructivo donde se evaluará el crecimiento de la planta, el daño ocasionado por la bacteria y el control del bacteriófago.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum* L., *Xanthomona campestris* pv. *vesicatoria*, crecimiento, patogenicidad, biocontrol.



V SIMPOSIO NACIONAL DE  
HERRAMIENTAS DE  
BIOTECNOLOGÍA  
PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:

**Generación de una escala del daño de la mancha bacteriana en plantas de chile "chilaca"**

Realizado por:

**Susana Bautista Villegas**

Gabriel Rincón Enriquez | Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar  
Nuria Gómez Dorantes | Philippe Lobit | Jhony Navat Enriquez Vara  
Cecilia Guízar González | Luis López Pérez

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE.

Realizado los días 3,4 y 5 de Octubre del presente  
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Gabriel Rincón Enriquez  
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acevedo Hernández  
CUC

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández  
CUCBA

Dr. Saúl Fraire Velázquez  
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018

**Efecto de los hongos micorrízicos arbusculares y bacteriófagos en el control de la mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) en el cultivo de chile “chilaca” en condiciones de invernadero.** [Effect of the arbuscular mycorrhizal fungi and bacteriophages in the control of the bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) in the “chilaca” pepper culture under greenhouse conditions]. Susana Bautista-Villegas, Gabriel Rincón-Enríquez, Nuria Gómez-Dorantes, Philippe. Lobit, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Jonhy Navat Enríquez-Vara, Cecilia Guízar-González, Luis Pérez-López. IIAF, UMSNH-CIATEJ. Email: [Subavi28@gmail.com](mailto:Subavi28@gmail.com)

En un esfuerzo por desarrollar estrategias más sustentables e integrales para controlar la mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*), enfermedad de importancia en el cultivo de chile. Se evaluó el efecto de combinaciones de bacteriófagos y diferentes niveles de hongos micorrízicos arbusculares (*Rizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae*, un consorcio Las Campesinas y sin HMA) para controlar la mancha bacteriana en chile. A los 38 días de haber inoculado las plantas con HMA, se inocularon 2 mL de solución de *X. vesicatoria* a razón de  $1 \times 10^7$  UFC, 24 h después se aplicó la misma concentración (UFP) y volumen de bacteriófagos microencapsulados en alginato de sodio. A los 21 días después de la inoculación, se midió altura de plantas, área foliar, biomasa seca de raíz y follaje, porcentaje de colonización micorrízica (PCM), presencia de bacteriófagos y *X. vesicatoria* en tejidos vegetales, defoliación, hojas con manchas y área foliar dañada. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza y pruebas Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se encontró un PCM del 36% y presencia de bacteriófagos y *X. vesicatoria* en tejidos. El tratamiento de *R. intraradices* + bacteriófagos presentó mayor número de hojas (13) y presentó la menor defoliación (13.33%) respecto a plantas control (Sin HMA y sin bacteriófago). Los resultados indican que *R. Intraradices* combinado con bacteriófagos muestra un grado de biocontrol contra la mancha bacteriana.



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:

**Hongos micorrízicos arbusculares como promotores de crecimiento en plantas de chile var. "Chilaca"**

Realizado por:

**Susana Bautista Villegas**

Gabriel Rincón Enriquez | Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar | Nuria Gómez Dorantes  
Philippe Lobit | Jhony Navat Enriquez Vara | Cecilia Guizar González | Luis López Pérez

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE

Realizado los días 3, 4 y 5 de Octubre del presente  
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Saúl Fraire Velázquez  
COORDINADOR DE LA RED

Dr. Gabriel Rincón Enriquez  
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Acavedo Hernández  
CUO

Dra. Carlota Vanesia Sánchez Hernández  
CUCBA

Año 2018

**Hongos micorrízicos arbusculares en el control de la mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) en el cultivo de chile “chilaca” en condiciones de invernadero.** [Arbuscular mycorrhizal fungi in the control of the bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*) in the “chilaca” pepper culture under greenhouse conditions]. Susana Bautista-Villegas, Gabriel Rincón-Enríquez, Nuria Gómez-Dorantes, Philippe Lobit, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Jonhy Navat Enríquez-Vara, Cecilia Guízar-González, Luis Pérez-López. Email: [Subavi28@gmail.com](mailto:Subavi28@gmail.com)

La mancha bacteriana (*Xanthomias campestris* pv. *vesicatorias*) es una enfermedad devastadora que afecta al cultivo del chile. En la búsqueda de alternativas de control sustentables, se evaluó el efecto de tres inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (*Rizophagus intraradices*, *Funneliformis mosseae* y un consorcio nativo Las Campesinas) y un testigo (Sin HMA) contra el daño causado por *X. vesicatoria* en plantas de chile “chilaca” en condiciones de invernadero. A los 38 días de haber inoculado las plantas con los HMA, se inocularon 2 mL de solución de *X. vesicatoria*, a razón de  $1 \times 10^7$  UFC. 22 días después de esta inoculación, se midió altura de planta, grosor de tallo, número de hojas, biomasa seca de follaje y raíz, área foliar, porcentaje de colonización (PCM) y densidad de esporas; así como manchas foliares, área foliar dañada y defoliación ocasionado por la enfermedad. Los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza y prueba Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Se encontró un PCM del 33% en promedio de las plantas con HMA, plantas inoculadas con *R. intraradices* presentaron la mayor cantidad de hojas (13) y la menor defoliación (2 hojas); mientras que las plantas inoculadas con el consorcio Las Campesinas presentaron el menor número de manchas foliares (21) en comparación a plantas no micorrizadas. Los resultados muestran que *R. intraradices* promovió el crecimiento y tuvo un efecto bioprotector contra *X. vesicatoria* en plantas de chile “chilaca”.