

## *Streptomyces* PRIO41 como promotor de crecimiento en plantas de chile jalapeño y agente de control biológico de *Fusarium*

*Streptomyces* PRIO41 as plant growth promoter of jalapeño pepper plants and as biocontrol agent of *Fusarium*

Robles-Hernández L, J Hernández-Huerta, AC González-Franco, OA Hernández-Rodríguez, A Núñez-Barrios, R Pérez-Leal

**Resumen.** El chile es uno de los principales cultivos de importancia económica en México, y la marchitez causada por *Fusarium* es una de las enfermedades que limitan su producción. Además, el uso inadecuado de los agroquímicos en el cultivo generan problemas ambientales y de salud. Por esto, en este estudio se evaluó la efectividad de *Streptomyces* sp. PRIO41 como agente de biocontrol de *Fusarium* spp. y como promotor del crecimiento de plantas de chile. Para ello, se determinó *in vitro* la patogenicidad y virulencia de *Fusarium* spp. en semillas de chile jalapeño, así como la interacción de los aislados fúngicos con *Streptomyces* sp. PRIO41 bajo 2 condiciones nutricionales. Finalmente, en invernadero se evaluó la efectividad de *Streptomyces* PRIO41 como (1) biocontrol de la marchitez causada por *Fusarium*, y (2) promotor del crecimiento de plantas de chile. Los resultados mostraron que todos los aislados fúngicos causaron sintomatología en semilla y plántulas de chile con diferentes grados de virulencia. En las interacciones *in vitro*, *Streptomyces* mostró el rango de mayor efectividad respecto a aislados de *Fusarium* en el medio pobre en nutrientes (37,6%-100%) con efectos fungicidas en algunos casos. En invernadero, *Streptomyces* PRIO41 redujo la marchitez causada por *Fusarium* hasta en un 40% y afectó positivamente todos los parámetros de crecimiento vegetativo, particularmente altura de planta, área foliar, longitud de raíz, y biomasa seca foliar y radical. Este estudio muestra el potencial de *Streptomyces* PRIO41 como agente de control biológico de *Fusarium* spp. y como biofertilizante en plantas de chile.

**Palabras clave:** Actinobacteria; Biofertilizante; Agente antifúngico; Biocontrol.

**Abstract.** Chili pepper is one of the main crops of economic importance in Mexico, and *Fusarium* wilting is a disease that limits its production. In addition, the inappropriate use of agrochemicals in farming activities generate environmental and health problems. Therefore, in this study the effectiveness of *Streptomyces* sp. PRIO41 was evaluated as a (1) biocontrol agent of *Fusarium* spp and (2) plant growth promoter bacteria. Assays of pathogenicity and virulence of *Fusarium* spp. in jalapeño pepper seeds, and interactions of these pathogens with *Streptomyces* PRIO41 were evaluated under two nutritional conditions. In the greenhouse, the effectiveness of *Streptomyces* sp. PRIO41 was determined as a (1) biocontrol of *Fusarium*, and (2) plant growth promoter of wilt of pepper plants. The results showed that all fungal isolates caused symptoms in pepper seeds and seedlings with different degrees of virulence. Interactions *in vitro* showed that *Streptomyces* showed the most effective range of virulence against *Fusarium* isolates in the poor medium (37.6%-100%), with fungicidal effects in some cases. In the greenhouse, *Streptomyces* PRIO41 reduced *Fusarium* wilting up to a 40%, and positively affected all vegetative growth parameters, particularly plant height, leaf area, root length, and leaf and root dry biomasses. This study showed the potential of *Streptomyces* PRIO41 as a biocontrol agent of *Fusarium* spp., and as a biofertilizer of pepper plants.

**Keywords:** Actinobacterium; Biofertilizer; Antifungal; Biocontrol.

## INTRODUCCIÓN

El estado de Chihuahua ocupa el primer lugar en México en producción del cultivo de chile con 562166,52 ton, y un valor de la producción de 1979 millones de pesos (SIAP-SAGARPA, 2012). Sin embargo, una de las limitantes en la producción de este cultivo en el Estado, es la incidencia de la “marchitez del chile”, causada principalmente por *Fusarium* spp. (González-Chavira et al., 2002; Guerrero et al., 2004). Esta enfermedad provoca la muerte prematura de la planta por marchitamiento asociado a la obstrucción de haces vasculares (Chupp, 2006). El control de la enfermedad se realiza con agroquímicos, pero su empleo indiscriminado ha causado residualidad, afectando la microflora benéfica del suelo, cuerpos de agua, flora, fauna, y principalmente ha causado la resistencia por parte del fitopatógeno, lo cual dificulta su control (Lucas, 1998; Agrios, 2005). Por esto, se han desarrollado nuevas alternativas de control como el uso de microorganismos antagonistas. Los actinomicetos, como agentes de control biológico, han demostrado ser buenos antagonistas de hongos fitopatógenos ya que pueden colonizar el sistema radical de las plantas, producir metabolitos secundarios y enzimas extracelulares que les permiten suprimir el crecimiento de fitopatógenos (Doubou et al., 2001; Gnanamanickam et al., 2002; Strap y Crawford, 2006; Rosas, 2007). Además, este tipo de bacterias estimulan el crecimiento de plantas ya que solubilizan nutrientes del suelo y producen fitohormonas que inducen un mejor desarrollo de las plantas (Doubou et al., 2001; Fuentes-Ramirez y Caballero-Mellado, 2005; Kannaiyan y Kumar, 2006; Sousa et al., 2008; Khamna et al., 2010). En este contexto, se evaluó la efectividad de *Streptomyces* PRIO41 como promotor de crecimiento en plantas de chile y como agente de control biológico de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez en el cultivo de chile. Con este objetivo, se realizaron pruebas de patogenicidad y virulencia a partir de un panel de aislados de *Fusarium* obtenidos de muestreos de una región productora de chile. Además, se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* empleando dos sistemas nutricionales diferentes. Finalmente, se realizaron bioensayos de antagonismo *in vivo* con el aislado más virulento, y de promoción de crecimiento en plantas en ausencia del fitopatógeno. El inóculo de *Streptomyces* PRIO41 se generó a partir de dos condiciones nutricionales a fin de verificar su influencia en la efectividad de la bacteria.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Origen de los fitopatógenos.** Se utilizaron 26 aislados de *Fusarium* spp., obtenidos de muestreos de la región productora del cultivo de chile del estado de Chihuahua, los cuales fueron aislados e identificados en el Laboratorio de Microbiología Aplicada, Fitopatología y Fisiología Poscosecha de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

### Determinación de patogenicidad y virulencia *in vitro*.

Las estructuras monospóricas de *Fusarium* spp. se obtuvieron del crecimiento en placas de Czapek-Dox incubadas a 28 °C por 10 días. Dichas estructuras fueron suspendidas en buffer fosfato de sodio (0,05 M a pH 7), y filtradas con fibra de vidrio estéril; la cuantificación de esporas se realizó en una cámara de Neubauer.

Semillas de chile jalapeño genotipo Híbrido Grande se esterilizaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 4% (v/v) por 5 min; posteriormente, éstas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril por 5 min. Luego, las semillas se sumergieron por 10 min en solución monospórica de *Fusarium* en concentraciones de  $2 \times 10^6$  a  $9 \times 10^6$  UFC/mL. Las semillas tratadas se sembraron en frascos de vidrio con medio agar-agua al 0,6% (BD Bioxon), colocando cuatro semillas por frasco. Para el control se emplearon semillas esterilizadas tratadas con agua destilada estéril. Los tratamientos contaron con 10 repeticiones, las cuales se incubaron en una cámara de germinación (ICP-18C/i Lumistell) con un fotoperíodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h oscuridad a 18 °C por 17 días.

La evaluación de la virulencia se realizó cada cuatro días durante 17 días a partir del quinto día de la inoculación. El daño causado en las plántulas fue clasificado en base a la siguiente escala: 0=semilla germinada asintomática; 1=semilla germinada con crecimiento de micelio sobre cubierta seminal; 2=puntos necróticos aislados y/o con oscurecimiento en la base del hipocótilo y/o lesiones necróticas de 1 a 5 mm; 3=lesiones necróticas de 6 a 10 mm, y 4=germinado con necrosis total, lesiones necróticas de más de 11 mm o plántula con hipocótilo totalmente necrosado. El índice de severidad fue calculado de acuerdo a la metodología propuesta por Townsend y Heuberguer (1943). Al final del ensayo las especies de *Fusarium* fueron reaisladas de las plántulas para cumplir con los postulados de Koch.

**Pruebas de Antagonismo *in vitro*.** Se utilizó como antagonista la cepa *Streptomyces* sp. PRIO41, la cual fue previamente aislada y caracterizada por González-Franco (2004). *Streptomyces* fue inoculado en un extremo de placas Czapek-Dox 20% (Atlas, 2004) y de papa dextrosa agar (PDA, BD Bioxon) (Atlas, 2004), y se dejó crecer por siete días a 28 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, en las mismas cajas se sembraron los aislados de *Fusarium* spp., utilizando 0,5 mm<sup>2</sup> de crecimiento activo y colocándose a 4,5 cm de distancia del crecimiento bacteriano. Para los controles se sembraron los aislados de *Fusarium* de la manera antes descrita de forma individual. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

Los bioensayos se incubaron a 28 °C por siete días. Después del periodo de incubación, se determinó la inhibición del crecimiento fúngico de acuerdo a la metodología de Yuan y Crawford (1995). Asimismo, para determinar el efecto fungicida o fungistático, el micelio de los aislados de *Fusarium* más expuestos a *Streptomyces* fue transferido a medio fresco de

PDA y Czapek-Dox 20%, considerando un efecto fungistático cuando la inhibición del crecimiento fuera hasta de un 95% y fungicida cuando la inhibición fuera de 96 al 100%.

### Bioensayo en invernadero

**Producción de plántulas de chile jalapeño.** Las semillas de chile se esterilizaron de la manera antes descrita y se sembraron en bandejas conteniendo turba tinalizado de acuerdo a la metodología de Bashan y Holguín (1995). Éstas se colocaron en una cámara de germinación (ICP-18C/i Lumistell) con un fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h oscuridad a 18 °C. Las plántulas se regaron diariamente con agua destilada estéril hasta el momento del trasplante y se fertilizaron cada tercer día con una solución nutritiva diluida al 75%, la cual contenía 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6 mM  $\text{KNO}_3$ ; 4 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  por litro de solución.

**Obtención de los inóculos de *Streptomyces* PRIO41.** Bacterias en crecimiento activo proveniente de placas de PDA incubadas a 28°C por siete días, se utilizaron para inocular matraces con caldo nutritivo (CN, Bioxon) y medio líquido CM suplementado con 0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium* (González-Franco et al., 2003). Los matraces con los medios inoculados se colocaron en una agitadora-incubadora (Orbital Shaker, Thermo) a 120 rpm por cinco días a 28 °C. Se obtuvo el paquete celular al centrifugar (Thermo, IEC-MULTIRF R-404a) a 3000 rpm por 30 min a 25 °C. El crecimiento bacteriano fue resuspendido en caldos nuevos de CM y CN para preparar mezclas homogéneas con turba estéril; luego, las mezclas fueron incubadas a 28°C por 48 h previo a su uso en invernadero.

**Obtención de inóculo de *Fusarium*.** La cepa más virulenta de *Fusarium* (M3B) se seleccionó para realizar los bioensayos en invernadero. Ésta se inoculó en caldo Czapek-Dox (Atlas, 2004) y se incubó a 120 rpm por siete días a 28 °C. El caldo fúngico se agitó por 10 min en el vortex y se filtró con fibra de vidrio estéril, para luego centrifugarse a 3500 rpm a 7 °C por 20 min. El sobrenadante se removió cuidadosamente, y se agregó buffer de fosfatos de sodio 0,05 M pH 7 para lavar las estructuras monospóricas. El proceso de lavado se realizó 2 veces más, seguido siempre del proceso de centrifugado ya descrito. Las esporas fúngicas se cuantificaron con una cámara de Neubauer.

**Establecimiento del bioensayo.** Los tratamientos del experimento fueron: C=planta sin tratamiento microbiano; P=planta con *Fusarium* M3B; CM=planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM; CN=planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en CN; CMP=planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM más *Fusarium* M3B; CNP=planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en CN más *Fusarium* M3B. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento.

A plántulas de chile jalapeño en almácigo, con 5 a 6 hojas verdaderas, se les aplicaron las mezclas de sustrato/*Streptomyces* alrededor del cepellón. La concentración bacteriana en ambos tratamientos (CM-PRIO41 y CN-PRIO41) fue ajustada a  $3 \times 10^6$  UFC/g. Las plántulas tratadas se trasplantaron a macetas de 20 X 20 cm conteniendo una mezcla de turba y arena (3:1, v/v), la cual se esterilizó previamente 3 veces cada 3 días a 121 °C por 60 minutos. Las plantas se colocaron en el invernadero. La fertilización se realizó cada tres días por los primeros 20 días con la solución antes descrita al 75%; luego la concentración de la solución nutritiva se aplicó al 100%.

A los 45 días después de trasplante (dddt) se aplicó la solución monospórica de *Fusarium* M3B a una concentración de  $9 \times 10^5$  UFC/mL. Su aplicación se realizó en cuatro puntos alrededor del tallo a 3 cm de separación. En cada punto se hizo un orificio de 2 cm de profundidad, y cada uno se inoculó con 2 mL de la solución.

Además, las plantas fueron monitoreadas por la severidad de los daños en base a la siguiente escala: 0=planta con crecimiento y desarrollo normal; 1=marchitez y amarillamiento de follaje; 2=puntos necróticos y/o lesiones necróticas de más de 5 mm; 3=pudrición de cuello y defoliación parcial de planta; 4=muerte de la planta o total defoliación. El índice de severidad fue calculado de acuerdo a la metodología propuesta por Townsend y Heuberguer (1943). Al final del ensayo *Fusarium* M3B se realizó del área de transición de las lesiones de las plantas con la finalidad de cumplir con los postulados de Koch.

Las plantas se monitorearon cada cinco días después del trasplante durante 75 días, evaluando (1) altura de planta, (2) número de hojas, (3) índice de área foliar, utilizando para esta última un medidor de área foliar (marca CID, Inc. modelo CI-202); (4) estimación del verdor de las hojas empleando el medidor de clorofila (modelo SPAD-502 marca Minolta); (5) longitud de raíz, y (6) peso seco de la planta (tallo, hoja y raíz) usando un horno de secado marca Shell Lab modelo CE3F a 60 °C hasta tener peso constante.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** El ensayo de patogenicidad y virulencia *in vitro* se estableció bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones, donde la unidad experimental fue un frasco con 4 semillas. Asimismo, la interacción microbiana *in vitro* se estableció bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. El ensayo de biocontrol en invernadero se estableció bajo un diseño de bloques completamente al azar con cuatro repeticiones.

Los datos de la interacción microbiana *in vitro*, y los parámetros vegetativos de crecimiento del antagonismo en invernadero, se analizaron con el paquete estadístico SAS 9.1.3 (Institute Inc. Cary N. C. USA, 2006) realizándose un ANOVA y comparación de medias con Tukey y LSD ( $p=0,5$ ), respectivamente. Los datos de las pruebas de patogenicidad y virulencia *in vitro*, y grado de daño en invernadero, fueron analizados por medio de regresiones lineales simples en hoja de cálculo Microsoft Excel 2010.

## RESULTADOS

### Patogenicidad y virulencia *in vitro* de *Fusarium* spp.

Todos los aislados de *Fusarium* causaron daño sobre la semilla y durante el desarrollo de las plántulas de chile jalapeño con diferentes grados de virulencia (Fig. 1). Se presentó crecimiento micelial y producción de exudados sobre la cubierta seminal, necrosis del hipocótilo y/o epicótilo, y semillas sin germinar con necrosis interna. El análisis de regresión lineal simple del índice de severidad

de los aislados de *Fusarium* spp. mostró que existe una relación directamente proporcional entre la severidad causada por los aislados de *Fusarium* en las semillas de chile jalapeño y el tiempo. El aislado M3B causó el máximo daño en la semilla de chile en corto tiempo, con una pendiente de 8.083 ( $r^2 = 0,865$ ); 17 de los aislados causaron daños moderados en las semillas y plántulas, con pendientes de 4,916 a 6,895 ( $r^2 = 0,899$  a  $0,944$ ) y el resto de los aislados causaron daños menores con pendientes de 1,645 a 5,385 ( $r^2 = 0,7$  a  $0,95$ ) (Fig. 1).

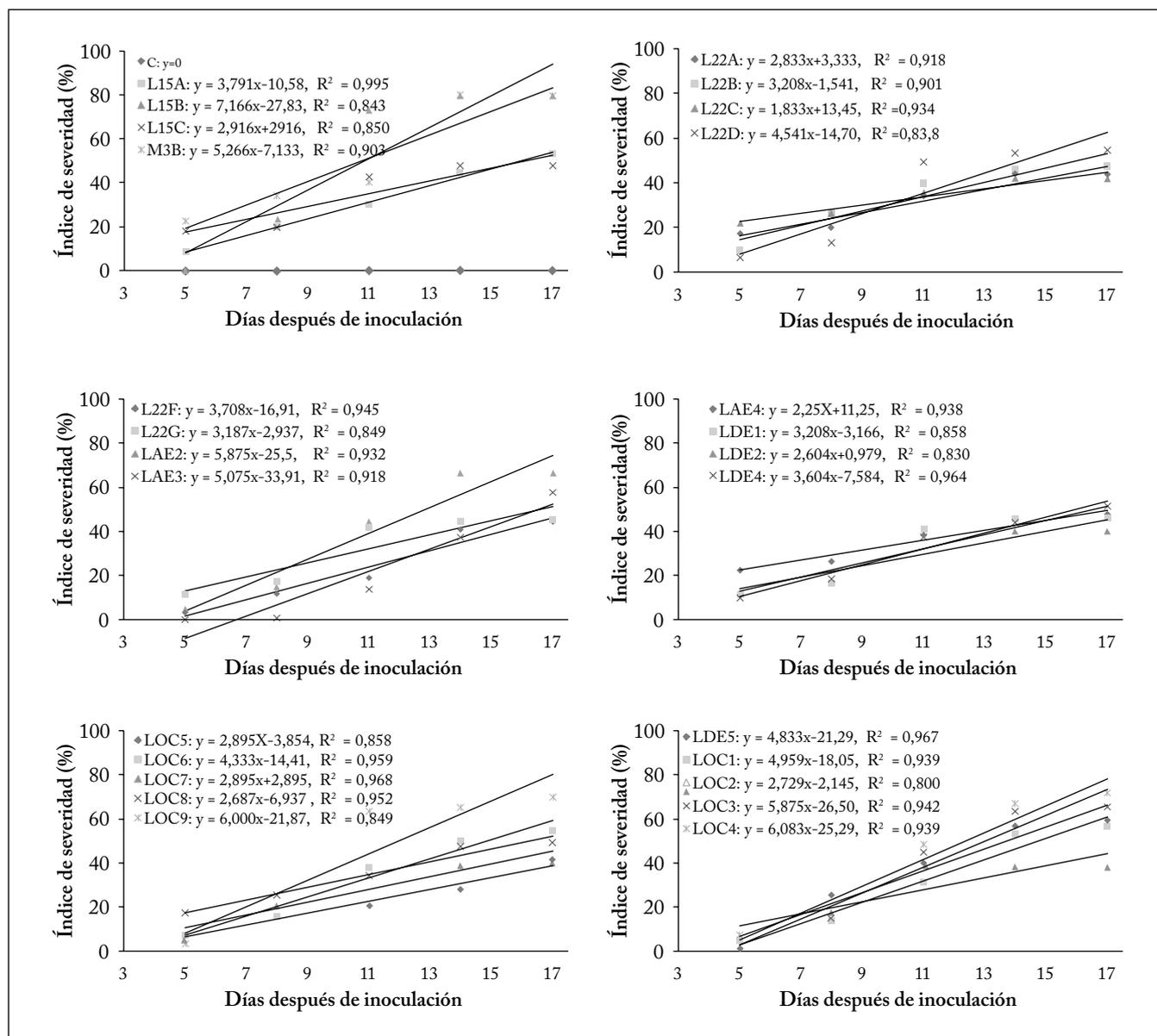


Fig. 1. Análisis de regresión lineal simple del índice de severidad de aislados de *Fusarium* sobre semillas de chile jalapeño bajo condiciones controladas.

Fig. 1. Simple linear regression analysis of the *Fusarium* severity indexes on jalapeño pepper seeds under controlled conditions.

**Antagonismo *in vitro*.** *Streptomyces* PRIO41 presentó actividad antagonica en los 26 aislados de *Fusarium* probados, mostrando diferentes grados de inhibición en los medios de cultivo PDA y Czapek-Dox 20% (Fig. 2). En promedio, la inhibición del crecimiento fue de 57,6% en PDA y 35,4% en Czapek-Dox 20%. En PDA se presentó una inhibición del crecimiento mínima de 37,6%, y porcentajes de inhibiciones del crecimiento superiores al 95% e incluso del 100%. Por otro lado, en el medio Czapek-Dox 20% la inhibición mínima observada fue de 15,20% y la máxima de 40,07% (Fig. 2).

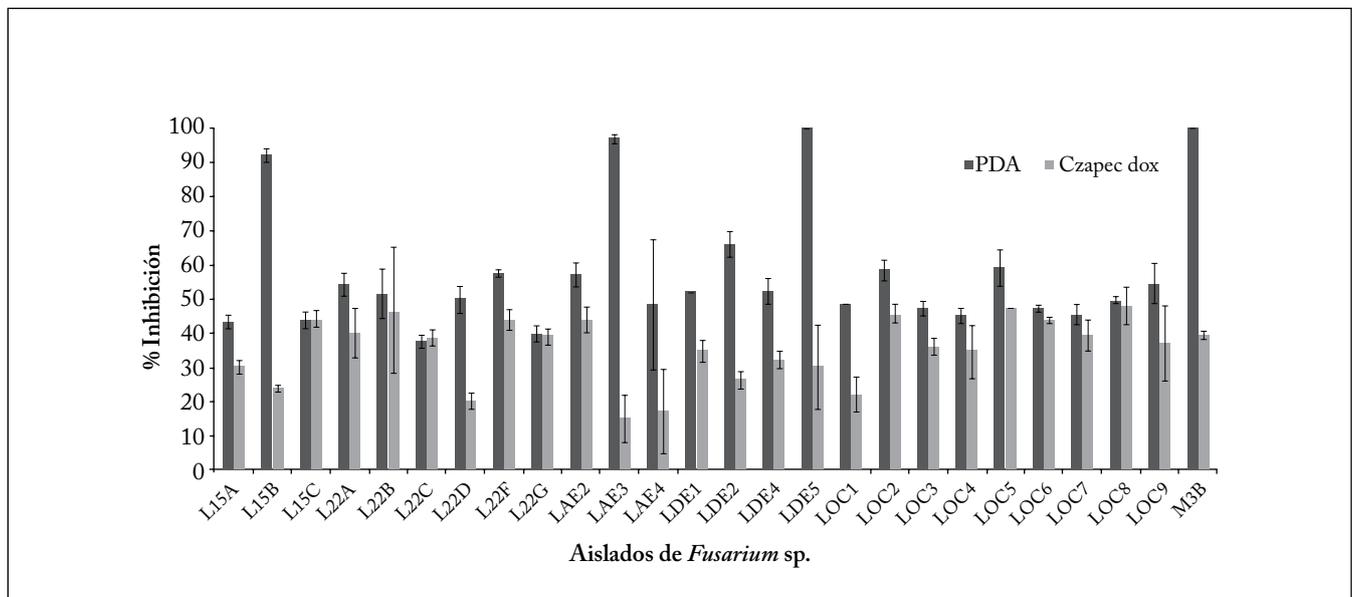
En esta investigación también se observó que los aislados fúngicos presentaron cambios morfológicos durante el bioensayo en ambos medios de cultivo, exhibiendo una disminución de la propagación del micelio, pigmentación distinta al control, presencia de exudados y desarrollo de crecimiento aéreo. Además, *Streptomyces* sp. PRIO41 presentó efecto fungicida sobre el 9,3% de los aislados de *Fusarium* en PDA, mientras que en Czapek-Dox 20%, solo se presentó un efecto fungistático.

**Bioensayo en invernadero.** En el experimento de invernadero se evaluó el efecto del *Streptomyces* como promotor del crecimiento en plantas (CM y CN vs C) y también como agente de biocontrol de la marchitez causada por *Fusarium* (CMP y CNP vs P). Los parámetros de crecimiento vegetativos del bioensayo en invernadero al día 75 después del trasplante evidenciaron la influencia positiva de los tratamientos con *Streptomyces* sobre el desarrollo de

las plantas (Tablas 1 y 2). El tratamiento CM incrementó significativamente la altura de planta con una media de 47,83 cm; el resto de los tratamientos fueron similares (Tabla 1). El número de hojas y área foliar se incrementaron en los tratamientos con sólo el antagonista (CM y CN), seguido por el control. Los tratamientos CMP y CNP presentaron el mismo número de hojas que P; sin embargo, en éste último no se logró medir área foliar. En la estimación de clorofila, los tratamientos CM y CN fueron iguales al control (34,73; 32,44 y 32,54 U SPAD, respectivamente), seguidos por CMP y CNP (15,58 y 14,84 U SPAD, respectivamente). En longitud de raíz, los tratamientos con *Streptomyces* con o sin patógeno (CM, CN, CMP y CNP) fueron significativamente superiores al control y al tratamiento P con promedios entre 28,62 y 30,87 cm.

En peso seco de la planta, sobresalieron los tratamientos con *Streptomyces* principalmente en peso seco de hoja y de raíz (Tabla 2). El tratamiento CM fue significativamente superior a otros tratamientos con un promedio de 2,92 g/planta seguido por CN y C (2,57 y 2,50 g/planta, respectivamente). La misma tendencia se observó en peso seco de raíz donde CM fue estadísticamente superior (6,69 g/planta) seguido por CN (5,50 g/planta). Los tratamientos CMP y CNP mostraron mayor peso seco de hoja y raíz que el tratamiento P, aunque no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

El análisis del seguimiento de los daños presentes en los tratamientos con el fitopatógeno, mostró la influencia del *Streptomyces* para reducir la severidad de la enfermedad (Figs. 3



**Fig. 2.** Efecto de *Streptomyces* PRIO41 sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium* spp. en medios de cultivo PDA y Czapek-Dox 20%, a los 7 días de interacción. Las barras en la gráfica indican la desviación estándar de tres repeticiones.

**Fig. 2.** Effect of *Streptomyces* PRIO41 on percentage inhibition of growth of *Fusarium* spp. in PDA and Czapek-Dox 20% culture media at 7 days of interaction. Bars in the graph indicate the standard deviation of three replicates.

**Tabla 1.** Parámetros de crecimiento vegetativos aéreos de plantas de chile jalapeño 75 días después del trasplante bajo condiciones de invernadero tratadas con *Streptomyces* PRIO41 y/o *Fusarium* sp. M3B.

**Table 1.** Aboveground growth vegetative parameters of jalapeño pepper plants 75 days after transplantation under greenhouse conditions treated with *Streptomyces* PRIO41 and/or *Fusarium* M3B.

Tratamiento	Variables			
	Altura (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Clorofila (SPAD)
C	41,75 b†	78,75 ab	589,0 ab	32,54 a
P	40,83 b	71,50 b	ND	11,11 b
CM	47,83 a	89,00 ab	661,1 a	34,73 a
CMP	38,16 b	70,00 b	338,2 b	15,58 b
CN	40,66 b	95,25 a	637,7 a	32,44 a
CNP	39,67 b	72,00 b	347,7 b	14,84 b

† Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). C= planta sin inoculación microbiana; P= planta con *Fusarium* M3B, CM= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*]; CN= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo; CMP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*] y más *Fusarium* M3B; CNP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo, más *Fusarium* M3B. N.D. No determinada.

† Means followed by the same letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ). Where: C= non-inoculated plant; P= Plant with *Fusarium* sp. M3B; CM= Plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin and 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall]; CN= Plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in nutrient broth; CMP= plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin and 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall] plus *Fusarium* sp. M3B; CNP= Plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in nutrient broth plus *Fusarium* sp. M3B; N.D. Not determined.

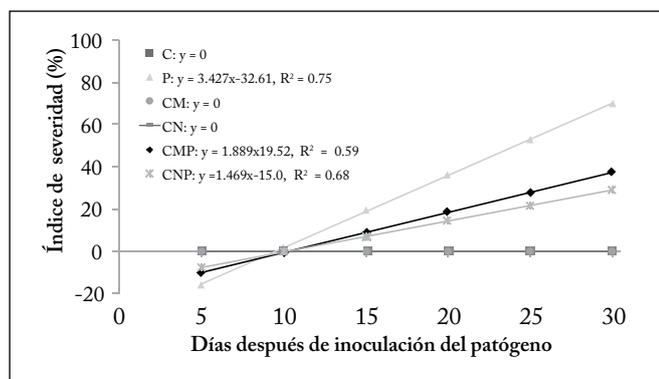
**Tabla 2.** Longitud de raíz y biomasa seca de plantas de chile jalapeño 75 días después del trasplante bajo condiciones de invernadero tratadas con *Streptomyces* PRIO41 y/o *Fusarium* M3B.

**Table 2.** Root length and dry biomass of jalapeño pepper plants 75 days after transplantation under greenhouse conditions treated with *Streptomyces* PRIO41 and/or *Fusarium* M3B.

Tratamiento	Variables		
	PSH (g/planta)	PSR (g/planta)	LR (cm)
C	2,50 ab†	3,98 a	3,83 bc
P	1,93 c	3,16 a	1,98 c
CM	2,92 a	3,82 a	6,69 a
CMP	2,12 bc	3,12 a	2,13 c
CN	2,57 ab	3,88 a	5,50 ab
CNP	2,17 bc	3,31 a	2,63 c

† Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ). C= planta sin inoculación microbiana; P= planta con *Fusarium* M3B; CM= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*]; CN= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo; CMP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*] más *Fusarium* M3B; CNP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo, más *Fusarium* M3B; PSH= peso seco de hojas; PST= peso seco de tallo; PSR= peso seco de raíz; LR= longitud de raíz.

† Means followed by the same letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ). Where: C= non-inoculated plant; P= Plant with *Fusarium* sp. M3B; CM= Plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin and 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall]; CN= Plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in nutrient broth; CMP= plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin and 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall] plus *Fusarium* sp. M3B; CNP= Plant with *Streptomyces* sp. PRIO41 grown in nutrient broth plus *Fusarium* sp. M3B; PSH= leaf dry weight; PST= stem dry weight; PSR= root dry weight; LR= Root length.



**Fig. 3.** Regresión lineal simple del avance de marchitez en plantas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero tratadas con *Fusarium* M3B y/o *Streptomyces* PRIO41. C= planta sin inoculación microbiana; P= planta con *Fusarium* M3B; CM= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*]; CN= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo; CMP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*] más *Fusarium* M3B; CNP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo, más *Fusarium* M3B.

**Fig. 3.** Simple linear regression of the progress of *Fusarium* wilt in jalapeno plants under greenhouse conditions treated with *Fusarium* M3B and/or *Streptomyces* PRIO41. C= non-inoculated plant; P= Plant with *Fusarium* M3B; CM= Plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin and 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall]; CN= Plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in nutrient broth; CMP= plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin & 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall] plus *Fusarium* M3B; CNP= Plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in nutrient broth plus *Fusarium* M3B.

y 4). Los tratamientos CNP y CMP mostraron una tendencia similar de la severidad en planta durante todo el experimento con pendientes de 1,46 ( $r^2=0,6857$ ) y 1,89 ( $r^2=0,6987$ ) respectivamente, mientras que en el tratamiento P fue de 3,42 ( $r^2= 0,7618$ ). El tratamiento CNP mostró el menor daño al final del experimento (29,8%), seguido de CMP (37,4%) y por último P (70,22%).

## DISCUSIÓN

Las pruebas de patogenicidad y virulencia del panel de aislados de *Fusarium* resultaron efectivas para seleccionar el aislado más agresivo, al determinar su índice de severidad y su seguimiento a través del tiempo. Resultados similares fueron reportados por Apodaca et al. (2004), donde estudios de patogenicidad y virulencia con cepas de *F. oxysporum* en Chile, causaron una severidad del 72% al séptimo día después de la inoculación.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* con todos los aislados de *Fusarium* permitió evaluar la diversidad de respuesta de las plantas en una región productora de Chile, con probablemente distintos mecanismos de acción que contribuirían a protegerse.

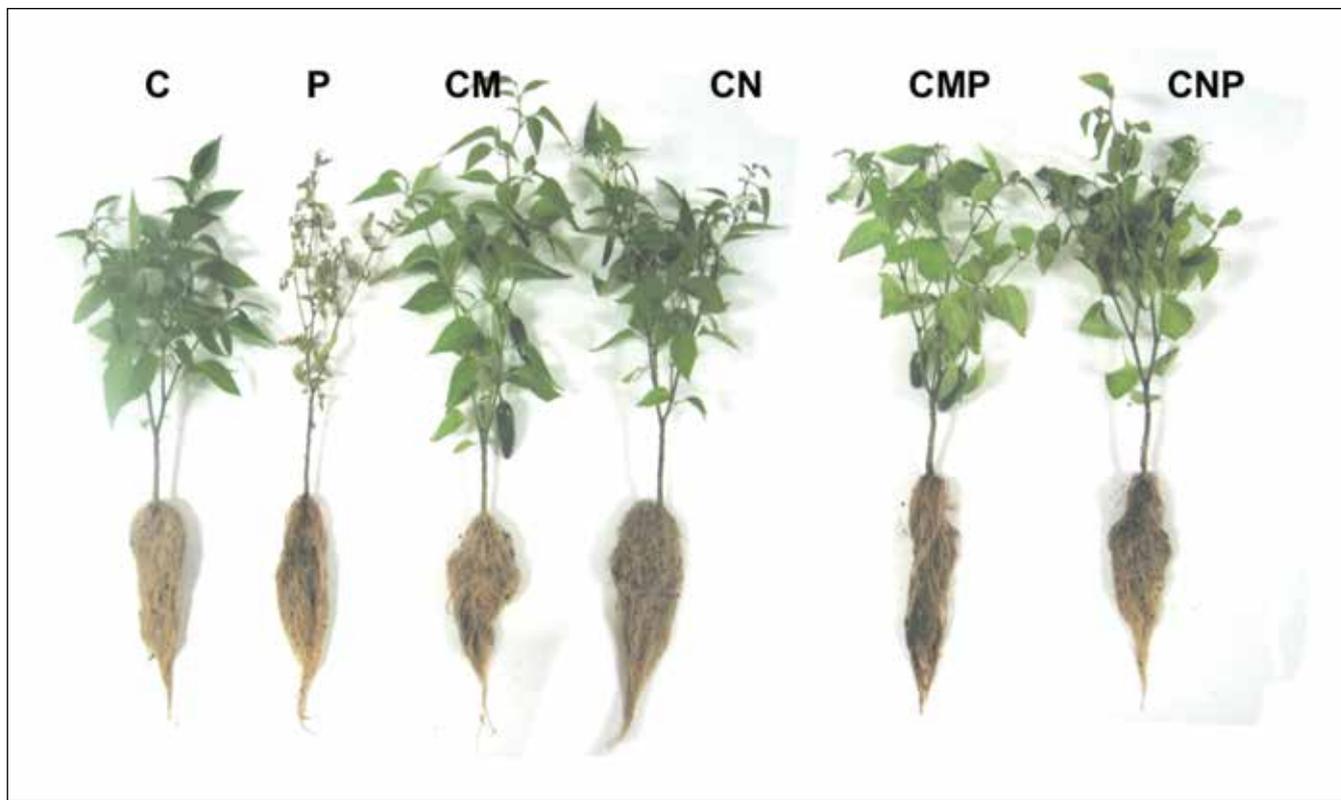
Además, la prueba se realizó bajo dos condiciones nutricionales (medio rico y pobre en nutrientes) para no sobreestimar la capacidad de biocontrol de PRIO41, así como para obtener un rango de efectividad con la diversidad de aislados fúngicos. *Streptomyces* sp. PRIO41 mostró mayor antagonismo y efecto fungicida frente a los aislados de *Fusarium* en el medio pobre en nutrientes (PDA), cuya fuente de carbono fue solo dextrosa. En el medio con mayor contenido de nutrientes (Czapeck-Dox 20%), que tuvo como fuente de carbono sacarosa y como fuente de nitrógeno  $\text{NaNO}_3$ , el desarrollo y efecto antagónico fue 23% menor. Estudios previos indican que *Streptomyces* sp. exhibe mayor desarrollo y actividad antimicrobiana en medios de cultivo que contienen dextrosa como fuente de carbono, mientras que la sacarosa es una fuente pobre de carbono para la producción de antibióticos; también otros autores encontraron que el uso de distintas fuentes de nitrógeno puede afectar el desarrollo de la bacteria y su capacidad de producir antibiosis (Demain, 1991; Shapiro, 1991; Pandey et al., 2005; Antonova-Nikolova et al., 2007).

En las pruebas de antagonismo *in vitro* también se observaron cambios en la morfología de los patógenos; alteraciones similares han sido detectadas en otros estudios (Xing y Westphal, 2007). Dichos cambios morfológicos podrían atribuirse a la difusión de compuestos antifúngicos producidos por *Streptomyces* en los distintos medios de cultivo.

Los efectos de *Streptomyces* como promotores del crecimiento en plantas se han atribuido a su capacidad de (1) producir sideróforos (Crowley et al., 1991; Tokala et al., 2002; El-Mehalawy et al., 2007), (2) sintetizar sustancias promotoras del crecimiento como el ácido indolacético (El-Mehalawy et al., 2007; Sousa et al., 2008), y (3) solubilización de fósforo (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Asimismo, se ha reportado que el empleo de extractos del cultivo de *Streptomyces* spp. puede promover el crecimiento en plantas (Doubou et al., 2001). En esta investigación, PRIO41 demostró superioridad en la mayoría de los parámetros de crecimiento vegetativo evaluados, donde sobresalieron altura de planta, área foliar, longitud de raíz, así como biomasa seca foliar y radical. Estudios especializados en la interacción microorganismo planta deben llevarse a cabo para elucidar los cambios bioquímicos que pudiera estar generando la bacteria en la planta.

Estudios previos en el control biológico de *Fusarium* spp. en otros cultivos con cepas de *Streptomyces* mostraron una reducción de la severidad de la enfermedad en un intervalo de 24 al 50% (Hiltunen et al., 1995; Singh et al., 1999; Mounssa y Rizk, 2002; Cao et al., 2005; Nourozian, et al., 2006). Esto coincide con los resultados generados en esta investigación, donde *Streptomyces* PRIO41 logró reducir la marchitez del Chile en un alto porcentaje.

Los mecanismos asociados al efecto antagónico de *Streptomyces* sp. sobre especies de *Fusarium* han sido descritos previamente en varios cultivos, los cuales incluyen: la generación de antibióticos, competencia por nutrientes, producción de sideróforos y micoparasitismo (Hiltunen



**Fig. 4.** Plantas de chile jalapeño 75 días después de trasplante bajo condiciones de invernadero tratadas con *Streptomyces* PRIO41 y/o *Fusarium* M3B. C= planta sin inoculación microbiana; P= planta con *Fusarium* M3B; CM= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*]; CN= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo; CMP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo CM suplementado [0,3% (v/v) de quitina coloidal y 0,1% (v/v) de pared celular de *Fusarium*] más *Fusarium* M3B; CNP= planta con *Streptomyces* PRIO41 crecida en caldo nutritivo, más *Fusarium* M3B.

**Fig. 4.** Jalapeno pepper plants 75 days after transplantation under greenhouse conditions treated with *Streptomyces* PRIO41 and/or *Fusarium* M3B, where: C= non-inoculated plant; P= Plant with *Fusarium* M3B; CM= Plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin & 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall]; CN= Plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in nutrient broth; CMP= plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in supplemented CM broth [0.3% (v/v) of colloidal chitin & 0.1% (v/v) of *Fusarium* cell wall] plus *Fusarium* M3B; CNP= Plant with *Streptomyces* PRIO41 grown in nutrient broth plus *Fusarium* M3B.

et al., 1995; Sigh et al., 1998; Getha y Vikineswary, 2002; Cao et al., 2005). En esta investigación, el *Streptomyces* sp. PRIO41 fue cultivado bajo 2 condiciones nutricionales para evaluar su efecto en planta. El medio de cultivo CM suplementado con quitina y pared celular de *Fusarium* ha mostrado favorecer la producción de quitinasas (Gonzalez-Franco et al., 2003), y consecuentemente la actividad contra hongos ricos en quitina como *Fusarium*. Sin embargo, en este estudio, el bioensayo en invernadero mostró que el cultivo de *Streptomyces* sp. PRIO41 en caldo nutritivo fue más efectivo que el cultivo de la bacteria en CM para reducir la severidad de la marchitez en chile. Esto sugiere que la cepa PRIO41 podría tener otro mecanismo de acción más efectivo contra este fitopatógeno; actualmente, los mecanismos de acción de esta cepa están siendo evaluados. Los resultados del presente estudio nos muestran el potencial de la cepa PRIO41 para

controlar la marchitez en chile causada por *Fusarium*, y promover el crecimiento de las plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por Fondos Mixtos-CONACYT-Gobierno del Estado de Chihuahua, Proyecto 22907.

## REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*, 5th edition. Elsevier Academic Press. Burlington, MA, USA. 947 p.
- Antonova-Nikolova, S., V. Stefanova y L. Yocheva (2007). Taxonomic study of *Streptomyces* sp. Strain 34-1. *Journal of Culture Collections* 5:10-15.

- Apodaca, S.M.A., M.E. Zavaleta, K.S. Osada, E.R. García y U.J.G. Valenzuela (2004). Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:7-13.
- Atlas, R.M (2004). Handbook of microbiological media. Chemical Rubber Company Press. Kentucky, USA. 2051 p.
- Bashan, Y. y G. Holguin (1995). Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in Soil. *Microbial Ecology* 29: 269-281.
- Cao, L., Z. Qiu, J. You, H. Tan y S. Zhou (2005). Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters* 247: 147-152.
- Chupp, C. (2006). Manual of vegetable plant diseases. Arora Offset Press. New Delhi, India. 672 p.
- Crowley, D.E., Y.C. Wang, C.P.P. Reid y P.J. Szanislo (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil* 130: 179-198.
- Demain, A.L. (1991). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. En: S. Shapiro (ed), pp. 127-134. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Chemical Rubber Company Press. Florida, USA, 312 p.
- Doumbou, C.L., M.K. Hamby-Salove, D.L. Crawford y C. Beaulieu (2001). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82: 85-102.
- El-Mehalawy, A. A., S. M. Hassanin, N.M. Hassanin y S.A. Zaki (2007). Induction of resistance and biocontrol of rhizoctonia in cotton against damping-off disease by rhizosphere microorganisms. *New Egyptian Journal of Microbiology* 17: 128-168.
- Fuentes-Ramirez, L.E. y J. Caballero-Mellado (2006). Bacterial Biofertilizers. En: Z.A. Siddiqui (ed.), pp.143-172. PGPR; Biocontrol and Biofertilization. Springer. Dordrecht, Holanda. 318 p.
- Getha, K. y S. Vikineswary (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28: 303-310.
- Gnanamanickam, S.S., P. Vasudevan, M.S. Reddy, J.W. Kloepper y G. Défago (2002). Principles of Biological Control. En: S.S. Gnanamanickam (ed.), pp. 1-9. Biological Control of Crop Diseases. Marcel Dekker. New York, USA, 468 p.
- González-Chavira, M.M., I. Torres-Pacheco y H. Guzmán-Maldonado (2002). Patógenos involucrados en la marchitez del chile. Proceedings of the 16th International Pepper Conference Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10-12.
- Gonzalez-Franco, A.C. (2004). Investigations of the distribution diversity and dynamics of mesophilic and thermophilic actinomycetes that produce hydrolytic enzymes and antifungal metabolites. Tesis doctoral. University of Idaho, Idaho, USA. 167 p.
- Gonzalez-Franco, A.C., L.A. Deobal, A. Spivak y D.L. Crawford (2003). Actinobacterial chitinase-like enzymes: profiles of rhizosphere versus non-rhizosphere isolates. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 683-698
- Guerrero, A.B.Z., C.M. González, P.I. Torres, G.R. González, M.H. Guzmán, G.R. Rodríguez, P.E. Villordo, C.B. Cabañas, L.A. Brav, G.L. Olvera y M.R. Rodríguez (2004). Diversidad genética de patógenos de raíz en Chile (*Capsicum annuum*) en la región norte centro de México. *Memorias de la Primera Convención Mundial de Chile*. pp. 67-72.
- Hiltunen, L.H., C.A. Linfield y J.G. White (1995). The potential for the biological control of basal rot of *Narcissus* by *Streptomyces* sp. *Crop Protection* 14: 539-542.
- Kannaiyan, S. y K. Kumar (2006). Biological Fertilizers for Sustainable Rice Production. En: M. K. Rai (ed.), pp. 89-115. Handbook of Microbial Fertilizers. Food Products Press. New York, USA. 579 p.
- Khamna, S., A. Yokota, J.F. Peberdy y S. Lumyong (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsian Journal of BioSciences* 4: 23-32.
- Lucas, J.A. (1998). Plant pathology and Plant Pathogens, Blackwell Science, UK.
- Moussa, T.A.A. y M.A. Rizk (2002). Biocontrol of sugarbeet pathogen *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. by *Streptomyces aureofaciens*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5: 556-559.
- Nourozian, J., H.R. Etebarian y G. Khodakaramian (2006). Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Journal Sciences Technology* 28: 29-38.
- Pandey, A., A. Shukla y S.K. Majumdar (2005). Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an antibacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology* 4: 909-910.
- Rosas, S. (2007). Role of Rhizobacteria in Biological Control of Plant Diseases. En: S. B. Chincholkar and K. G. Mukerji (eds.), pp. 75-102. Biological Control of Plant Diseases. The Harworth Press. New York, USA. 426 p.
- Shapiro, S. (1991). Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. En: S. Shapiro (ed.), pp. 135-199. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Chemical Rubber Company press. Florida, USA, 312 p.
- Singh, P.P., Y.C. Shin, C.S. Park y Y.R. Chung (1999). Biological control of *fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89: 92-99.
- SAGARPA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2012). Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (consulta, junio, 2014).
- Sousa, C.S., A.C.F. Soares y M.S. Garrido (2008). Characterization of streptomycetes with potential to promote plant growth and biocontrol. *Scientia Agrícola. (Piracicaba, Brazil)* 65: 50-55.
- Strap, J.L. y D.L. Crawford (2006). Ecology of *Streptomyces* in Soil and Rhizosphere. En: J.E. Cooper and J.R. Rao (eds.), pp. 166-180. Molecular Approaches to Soil Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis. CAB International. U.K. 297 p.
- Tokala, R.K., J.L. Strap, C.M. Jung, D.L. Crawford, M.H. Salove, L.A. Deobald, J.F. Bailey y M.J. Morra (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2161-2171.
- Townsend, G. y J. Heuberguer (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 60: 340-343.
- Xing, L.J. y A. Westphal (2007). Inhibition of *Fusarium virguliforme* by prokaryotes *in vitro*. *Subtropical Plant Science* 59: 24-29.
- Yuan, W.M. y D.L. Crawford (1995). Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3119-3128.