

Biorational control of *Phytophthora capsici* in pepper plants using *Streptomyces* spp.

Control biorracional de *Phytophthora capsici* en plantas de chile mediante *Streptomyces* spp.

Jesús Rafael Trinidad-Cruz¹; Gabriel Rincón-Enríquez¹;
Zahaed Evangelista-Martínez²; Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar^{1*}

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Camino Arenero, núm. 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco, C. P. 45019, MÉXICO.

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) - Subse de Sureste. Tablaje Catastral 31264, Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto km 5.5, Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, Mérida, Yucatán, C. P. 97302, MÉXICO.

*Corresponding author: eqaguilar08@gmail.com, tel. 333 345 52 00, ext. 1730.

Abstract

Pepper wilt, caused by *Phytophthora capsici*, is one of the main threats faced during pepper production. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of *Streptomyces* spp. in the biological control of *P. capsici* under *in vitro* and *in vivo* conditions. The *in vitro* antagonistic activity of strains ABV38, ABV39 and ABV45 was examined by means of dual confrontation tests. Broth culture supernatant (BCS) from the growth of the strains was irrigated on pepper plants inoculated with *P. capsici* CH11 (PC CH11) to evaluate wilt suppression. Molecular identification of the strains was carried out by analyzing the partial sequence of the 16S rRNA gene. Under *in vitro* conditions, strains ABV38, ABV39 and ABV45 inhibited the mycelial growth of PC CH11 by 51, 28 and 50 %, respectively. In the *in vivo* evaluation, the BCSs of strains ABV38 and ABV45 showed a wilt suppressive effect, with plant survival of 77 and 94 %, respectively. Strain ABV39 did not show a wilt suppressive effect (0 % survival), and nor did the untreated plants. Molecular identification indicated that strains ABV39, ABV38 and ABV45 belong to the genus *Streptomyces*, of which ABV38 and ABV45 have potential for biorational control of pepper wilt.

Keywords: actinobacteria, actinomycetes, *Capsicum annuum* L., wilt, biological control, oomycete.

Resumen

La marchitez del chile, causada por *Phytophthora capsici*, es una de las principales amenazas durante la producción del cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Streptomyces* spp. en el control biológico de *P. capsici* en condiciones *in vitro* e *in vivo*. La actividad antagonica *in vitro* de las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 se realizó mediante ensayos de confrontación dual. El sobrenadante del caldo de cultivo (SNC) del crecimiento de las cepas se irrigó en plantas de chile inoculadas con *P. capsici* CH11 (PC CH11) para evaluar la supresión de la marchitez. La identificación molecular de las cepas se realizó mediante el análisis de la secuencia parcial del gen ARNr 16S. En condiciones *in vitro*, las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 inhibieron el crecimiento micelial de PC CH11 en 51, 28 y 50 %, respectivamente. En la evaluación *in vivo*, los SNC de las cepas ABV38 y ABV45 mostraron un efecto supresor de la marchitez, con una supervivencia de las plantas de 77 y 94 %, respectivamente. La cepa ABV39 no mostró un efecto supresor de la marchitez (supervivencia de 0 %), al igual que las plantas no tratadas. La identificación molecular indicó que las cepas ABV39, ABV38 y ABV45 pertenecen al género *Streptomyces*; de las cuales, ABV38 y ABV45 poseen potencial para el control biorracional de la marchitez del chile.

Palabras clave: actinobacterias, actinomicetos, *Capsicum annuum* L., marchitez, control biológico, oomiceto.



Introduction

Phytophthora species (> 60) are a threat to different agronomically and ecologically important plants, causing diseases such as wilting or rotting of root, crown, stems, leaves and fruits (Drenth & Guest, 2004; Jung et al., 2018). Among these species, *Phytophthora capsici* (PC) is considered a destructive pathogen that affects agricultural crops such as cucurbits, eggplant (*Solanum melongena* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and pepper (*Capsicum annuum* L.) (Lamour, Stam, Jupe, & Huitema, 2012). In Mexico, pepper is one of the main horticultural crops of economic importance. In 2018, Mexico ranked as the world's second largest pepper producer and exporter, producing nearly 3.4 million tons with a value of US \$844 million (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2019). Despite the above, diseases due to phytopathogens, such as wilt caused by PC, have affected the productivity of the pepper crop.

Phytophthora spp. zoospores are the organism's main propagule for survival, dispersal and infection; moreover, due to their motility, they can actively locate their hosts (Judelson & Blanco, 2005; Stanghellini, Kim, Rasmussen, & Rorabaugh, 1996). The use of chemical fungicides has been the main method of PC control; however, their constant use increases the risk of pathogen resistance (Wu et al., 2020). Therefore, other alternatives are required that, as a whole, allow for an integrated pest and disease management strategy focused on the development of sustainable agriculture (Lamichhane et al., 2017). In recent decades, the use of antagonistic microorganisms for disease control in plants has proven to be an alternative because microorganisms are specific to a phytopathogen, harmless to both non-target species and humans, and environmentally friendly (O'Brien, 2017).

Actinobacteria (commonly called actinomycetes) have potential as biological control agents, as they have the ability to inhibit or reduce the growth of plant pathogens through direct and indirect mechanisms such as the production of antibiotics, lytic enzymes, hyperparasitism, competition and induction of systemic resistance in plants (Kurth et al., 2014; Sharma & Salwan, 2018). Actinobacteria have demonstrated their *in vitro* potential as antagonists for different *Phytophthora* species.

Sadeghi, Koobaz, Azimi, Karimi, and Akbari (2017) demonstrated that *Streptomyces* spp. strains inhibit mycelial growth of *P. drechsleri* by 30 to 78 %. Fonseca-Ardila, Castellanos-Suárez, and León-Sicard (2011) report that actinobacterial isolates from fermented extracts of chipaca (*Bidens pilosa* L.) inhibit mycelial growth of *P. infestans* by 33 to 77 %. Arfaoui, Adam,

Introducción

Las especies de *Phytophthora* (> 60) son una amenaza para diferentes plantas de importancia agronómica y ecológica, ya que causan enfermedades como la marchitez o pudrición de la raíz, corona, tallos, hojas y frutos (Drenth & Guest, 2004; Jung et al., 2018). Entre dichas especies, *Phytophthora capsici* (PC) es considerado un patógeno destructivo que afecta a cultivos agrícolas como las cucurbitáceas, berenjena (*Solanum melongena* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.) (Lamour, Stam, Jupe, & Huitema, 2012). En México, el chile es uno de los principales cultivos hortícolas de importancia económica. Durante 2018, México se ubicó como el segundo productor y exportador a nivel mundial de chile, con una producción de casi 3.4 millones de toneladas y un valor de 844 millones de dólares (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2019). A pesar de lo anterior, las enfermedades debidas a fitopatógenos, como la marchitez causada por PC, han afectado la productividad del cultivo de chile.

Las zoosporas de *Phytophthora* spp. son su principal propágulo de supervivencia, dispersión e infección; además, debido a su motilidad pueden localizar activamente a sus hospedantes (Judelson & Blanco, 2005; Stanghellini, Kim, Rasmussen, & Rorabaugh, 1996). El uso de fungicidas químicos ha sido el principal método de control de PC; sin embargo, su uso constante incrementa el riesgo de resistencia del patógeno (Wu et al., 2020). Por lo anterior, se requieren otras alternativas que permitan, en conjunto, un manejo integrado de plagas y enfermedades enfocadas hacia el desarrollo de una agricultura sustentable (Lamichhane et al., 2017). En las últimas décadas, el uso de microorganismos antagonistas para el control de enfermedades en plantas ha demostrado ser una alternativa, esto debido a que los microorganismos son específicos para un fitopatógeno, inofensivos para especies no blanco, inocuos para el hombre y amigables con el ambiente (O'Brien, 2017).

Las actinobacterias (comúnmente llamadas actinomicetos) poseen potencial como agentes de control biológico, ya que tienen la capacidad de inhibir o reducir el crecimiento de fitopatógenos a través de mecanismos directos e indirectos como la producción de antibióticos, enzimas líticas, hiperparasitismo, competencia y la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Kurth et al., 2014; Sharma & Salwan, 2018). Las actinobacterias han demostrado su potencial *in vitro* como antagonistas para diferentes especies de *Phytophthora*.

Sadeghi, Koobaz, Azimi, Karimi, y Akbari (2017) demostraron que cepas de *Streptomyces* spp. inhiben

Bezzahou, and Daayf (2018) isolated bacteria (100 isolates) from the rhizoplane of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants and found that nine isolates, belonging to the genera *Streptomyces* spp. (3), *Bacillus* spp. (4), *Paenibacillus* sp. (1) and *Lysobacter* sp. (1) reduced the percentage of mycelial growth of *P. sojae* by 14 to 85 %. Chen, Chen, and Tsay (2016) reported the antagonistic activity of *S. plicatus* B4-7 against several *Phytophthora* species, and Evangelista-Martínez (2014) demonstrated the antagonistic potential of *Streptomyces* sp. CA-CIS-1.16CA (isolated from the soil of the “Los Petenes” biosphere reserve) against several phytopathogenic fungi, among them PC.

Actinobacteria are a prominent source of natural products. According to Bérdy (2012), actinobacteria account for 40.8 % of all bioactive metabolites of microbial origin. Nguyen et al. (2015) demonstrated that pyrrolidone carboxylic acid, isolated from *Streptomyces griseus* H7602, reduced PC mycelial growth from concentrations of 8 to 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In similar studies, Joo (2005) and Chen et al. (2016) evaluated the activity of the cell-free culture broth of *S. plicatus* B4-7 and *S. halstedii* AJ-7, respectively; in *in vitro* tests, both cultures inhibited the germination of PC zoospores. Lee, Moon, Yun, Yoo, and Hwang (2004) isolated the natural product thiobutacin from *Lechevalieria aerocolonigenes* VK-A9, a compound that inhibited the *in vitro* germination of PC zoospores at a concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of *Streptomyces* spp. in the biological control of *Phytophthora capsici* under *in vitro* and *in vivo* conditions.

Materials and methods

Plant material

Serrano pepper var. Camino Real F1 seeds (Harris Moran®, Seed Company) were used. The seeds were washed with running water to remove the fungicide coating and then sown in three plastic germination trays with 72 cavities (6×12, one seed per cavity); for this, a sand-peat mixture (Mix No. 3, Sunshine®) was used as substrate at a 1:1 (v/v) ratio and sterilized at 120 °C for 6 h at a pressure of 1.05 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$. Each tray was placed inside a base and covered with a transparent plastic dome, then placed in an incubation room at 21 ± 1 °C with a photoperiod of 16/8 h (light / dark). Irrigation was carried out with running water once a week.

Microbiological material

Actinobacteria from the microorganism collection of the Phytopathology Laboratory of the CIATEJ Plant Biotechnology Unit were used. The actinobacteria

el crecimiento micelial de *P. drechsleri* de 30 a 78 %. Fonseca-Ardila, Castellanos-Suárez, y León-Sicard (2011) mencionan que aislados actinobacterianos de extractos fermentados de chipaca (*Bidens pilosa* L.) inhiben el crecimiento micelial de *P. infestans* de 33 a 77 %. Arfaoui, Adam, Bezzahou, y Daayf (2018) aislaron bacterias (100 aislados) del rizoplane de plantas de soya (*Glycine max* [L.] Merr.), y encontraron que nueve aislados, pertenecientes a los géneros *Streptomyces* spp. (3), *Bacillus* spp. (4), *Paenibacillus* sp. (1) y *Lysobacter* sp. (1), redujeron el porcentaje de crecimiento micelial de *P. sojae* de 14 a 85 %. Chen, Chen, y Tsay (2016) reportaron la actividad antagónica de *S. plicatus* B4-7 contra varias especies de *Phytophthora*, y Evangelista-Martínez (2014) demostró el potencial antagonista de *Streptomyces* sp. CA-CIS-1.16CA (aislado de suelo de la reserva de la biosfera “Los Petenes”) contra varios hongos fitopatógenos, entre ellos PC.

Las actinobacterias son una fuente de productos naturales prominente. De acuerdo con Bérdy (2012), las actinobacterias aportaron el 40.8 % de todos los metabolitos bioactivos de origen microbiano. Nguyen et al. (2015) demostraron que el ácido pirrolidón carboxílico, aislado de *Streptomyces griseus* H7602, redujo el crecimiento micelial de PC desde concentraciones de 8 a 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En estudios similares, Joo (2005) y Chen et al. (2016) evaluaron la actividad del caldo de cultivo libre de células de *S. plicatus* B4-7 y *S. halstedii* AJ-7, respectivamente; en pruebas *in vitro*, ambos cultivos inhibieron la germinación de zoosporas de PC. Lee, Moon, Yun, Yoo, y Hwang (2004) aislaron el producto natural tiobutacina de *Lechevalieria aerocolonigenes* VK-A9, compuesto que inhibió la germinación *in vitro* de zoosporas de PC a una concentración de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Streptomyces* spp. en el control biológico de *Phytophthora capsici* en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile serrano var. Camino Real F1 (Harris Moran®, Seed Company). Las semillas se lavaron con agua corriente para eliminar la cubierta de fungicida y se sembraron en tres charolas plásticas de germinación con 72 cavidades (6×12, una semilla por cavidad); para ello, se utilizó como sustrato una mezcla de arena-turba (Mix No. 3, Sunshine®) en proporción 1:1 (v/v), esterilizada a 120 °C durante 6 h a una presión de 1.05 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cada charola se colocó dentro de una base y se cubrió con un domo de plástico transparente, luego se colocaron en un cuarto de incubación a 21 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). El riego se realizó con agua corriente una vez por semana.

used were ABV38, ABV39 and ABV45, previously isolated from the rhizosphere of *Agave* spp. (Rincón-Enríquez, López-Pérez, & Quiñones-Aguilar, 2014). In previous tests, these actinobacteria inhibited the *in vitro* growth of *Phytophthora capsici* CH11 (PC CH11) (Reyes-Tena, Fernández-Pavía, Rincón-Enríquez, López-Pérez, & Quiñones-Aguilar, 2014). Actinobacterial isolates were grown in potato-dextrose agar (PDA) culture medium with pH 7 (3 M NaOH) and were incubated at 21 ± 1 °C in the dark for 15 days. The PC CH11 strain was cultured in clarified V8 agar (50 mL·L⁻¹ of V8 juice, 0.5 g·L⁻¹ of CaCO₃ and 15 g·L⁻¹ of agar) and incubated at 21 ± 1 °C in the dark for 10 days.

Dual antagonistic activity bioassay

Actinobacteria ABV38, ABV39 and ABV45 were tested to determine their activity in inhibiting *in vitro* growth of PC CH11 in dual confrontation assays. A disk containing a 6 mm diameter actinobacterial isolate with 15 days of growth was deposited 1 cm from the edge of the Petri dish with PDA culture medium. The Petri dishes were pre-incubated before inoculating the phytopathogenic oomycete for 0, 3 and 5 days at 21 ± 1 °C in the dark (Evangelista-Martínez, 2014). After the pre-incubation time, a 6 mm diameter PC CH11 disk (10 days of growth) was deposited 1 cm from the edge of the Petri dish and opposite the disk with actinobacteria. Dishes inoculated only with PC CH11 at 1 cm from the edge served as the control. Antagonistic activity was determined 24 days after inoculation from the area of PC CH11 growth inhibition. PC CH11 growth in the control dishes was over the entire surface of the culture medium. For the evaluation, a completely randomized experimental design with three replicates was established, where three treatments were evaluated per actinobacterium, corresponding to the pre-incubation times (0, 3 and 5 days).

Production of broth culture supernatant

One disk of each actinobacterium on 6 mm diameter PDA was independently inoculated in 250 mL Erlenmeyer flasks with 125 mL of culture medium (potato-dextrose broth, pH 7) that had been previously sterilized (121 °C at 1.05 kg·cm⁻² for 20 min). The flasks were placed in an orbital incubator at 30 °C and 200 rpm for 20 days. Four flasks were inoculated for each actinobacterium. After incubation, the broth culture was centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. The broth culture supernatant (BCS) of each actinobacterium (unfiltered) was recovered and stored at 4 °C until use.

Production of *Phytophthora capsici* CH11 zoospores

Material microbiológico

Se utilizaron actinobacterias de la colección de microorganismos del Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología Vegetal del CIATEJ. Las actinobacterias utilizadas fueron ABV38, ABV39 y ABV45, aisladas previamente de la rizosfera de *Agave* spp. (Rincón-Enríquez, López-Pérez, & Quiñones-Aguilar, 2014). En pruebas anteriores, dichas actinobacterias inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora capsici* CH11 (PC CH11) (Reyes-Tena, Fernández-Pavía, Rincón-Enríquez, López-Pérez, & Quiñones-Aguilar, 2014). Los aislados actinobacterianos se cultivaron de manera rutinaria en medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA) con pH 7 (NaOH 3 M) y se incubaron a 21 ± 1 °C en oscuridad durante 15 días. La cepa de PC CH11 se cultivó en agar V8 clarificado (50 mL·L⁻¹ de jugo V8, 0.5 g·L⁻¹ de CaCO₃ y 15 g·L⁻¹ de agar) e incubó a 21 ± 1 °C en oscuridad durante 10 días.

Bioensayo de actividad antagónica dual

Las actinobacterias ABV38, ABV39 y ABV45 se probaron para determinar su actividad en la inhibición del crecimiento *in vitro* de PC CH11 en ensayos de confrontación dual. Un disco de un aislado actinobacteriano de 6 mm de diámetro de 15 días de crecimiento se depositó a 1 cm del borde de la caja Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas Petri se pre-incubaron antes de inocular el oomiceto fitopatogéno durante 0, 3 y 5 días a 21 ± 1 °C en oscuridad (Evangelista-Martínez, 2014). Después del tiempo de pre-incubación, se depositó un disco de PC CH11 de 6 mm de diámetro (10 días de crecimiento) a 1 cm del borde de la caja Petri y enfrente del disco con actinobacteria. Cajas inoculadas solo con PC CH11 a 1 cm del borde sirvieron como testigo. La actividad antagónica se determinó a los 24 días después de la inoculación a partir del área de inhibición del crecimiento de PC CH11. El crecimiento de PC CH11 en las cajas testigo fue en toda la superficie del medio de cultivo. Para la evaluación, se estableció un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, en donde se evaluaron tres tratamientos por actinobacteria, correspondientes a los tiempos de pre-incubación (0, 3 y 5 días).

Producción de sobrenadante del caldo de cultivo

Un disco de cada actinobacteria en PDA de 6 mm de diámetro se inoculó de manera independiente en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 125 mL de medio de cultivo (caldo de papa-dextrosa, pH 7) previamente esterilizado (121 °C a 1.05 kg·cm⁻² durante 20 min). Los matraces se colocaron en un incubador orbital a 30 °C y 200 rpm durante 20 días. Se inocularon cuatro matraces por cada actinobacteria. Después

Zoospore production was performed using the Ristaino (1990) technique, with slight modifications. PC CH11 cultures with 10 days of growth in clarified V8 agar (50 mL·L⁻¹ of V8 juice, 0.5 g·L⁻¹ of CaCO₃ and 15 g·L⁻¹ of agar) were used. The culture medium of each Petri dish was cut in half, and one of the halves was placed in another sterile Petri dish. Using a scalpel, the clarified V8 agar halves were cut into ~1 cm² squares and sterile distilled water was added to cover the agar squares. The Petri dishes were placed in an incubation room at 21 ± 1 °C in the dark. The distilled water was renewed daily for five days. Finally, the Petri dishes were brought to 4 °C for 1 h to induce zoospore release. The suspension was adjusted to 500 zoospores·mL⁻¹ using a hemocytometer.

Evaluation of biorational control of *Phytophthora capsici* CH11 *in vivo*

Three days before applying the treatments, the serrano pepper plants were irrigated with plenty of running water, and excess water from the base container was removed to avoid cross contamination. Ten mL of the BCS of actinobacteria ABV38, ABV39, and ABV45 were applied independently to each 25-day-old pepper plant. As a negative control, 10 mL of sterile distilled water were applied per plant, and the commercial product Infinito® (Bayer®, Mexico), recommended for the control of oomycetes, which contains fluopicolide (62.5 g·L⁻¹) and propamocarb hydrochloride (625 g·L⁻¹), was used as a chemical control. For the chemical control, a suspension was prepared at 3 mL·L⁻¹ of the concentrated product and 10 mL were added per plant. After applying the treatments, each plant was inoculated with 3 mL of the zoospore suspension (500 zoospores·mL⁻¹) of PC CH11, at a final concentration in the substrate of 50 zoospores·g⁻¹. The control plants were inoculated with 3 mL of sterile distilled water. After inoculation of the phytopathogenic oomycete, the plants were incubated at 21 ± 1 °C with a photoperiod of 16/8 h (light/dark) for 10 days. No further irrigation was applied to the plants.

For this test, a completely randomized experimental design with 10 treatments was used: T1) ABV38, T2) ABV38 + PC CH11, T3) ABV39, T4) ABV39 + PC CH11, T5) ABV45, T6) ABV45 + PC CH11, T7) control (healthy plants), T8) control + PC CH11 (diseased plants), T9) chemical control and T10) chemical control + PC CH11. The treatments were applied in trays with the pepper plants. One tray had 12 columns, each with six pepper plants. The end columns of the tray were excluded. The 10 internal columns were randomized to apply the treatments. The experimental unit consisted of six pepper plants, and the treatments were carried out in triplicate. The survival percentage of the plants was determined with the following formula:

de la incubación, el caldo de cultivo se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante del caldo de cultivo (SNC) de cada actinobacteria (no filtrado) se recuperó y almacenó a 4 °C hasta su uso.

Producción de zoosporas de *Phytophthora capsici* CH11

La producción de zoosporas se realizó mediante la técnica de Ristaino (1990), con ligeras modificaciones. Se utilizaron cultivos de PC CH11 de 10 días de crecimiento en agar V8 clarificado (50 mL·L⁻¹ de jugo V8, 0.5 g·L⁻¹ de CaCO₃ y 15 g·L⁻¹ de agar). El medio de cultivo de cada caja Petri se cortó a la mitad, y una de las mitades se colocó en otra caja Petri estéril. Con ayuda de un bisturí, se cortaron las mitades del agar V8 clarificado en cuadros de ~1 cm² y se agregó agua destilada estéril hasta cubrir los cuadros de agar. Las cajas Petri se colocaron en un cuarto de incubación a 21 ± 1 °C en oscuridad. El agua destilada se renovó diariamente durante cinco días. Finalmente, las cajas Petri se llevaron a 4 °C durante 1 h para inducir la liberación de las zoosporas. La suspensión se ajustó a 500 zoosporas·mL⁻¹ con ayuda de un hemocitómetro.

Evaluación del control biorracional de *Phytophthora capsici* CH11 *in vivo*

Tres días antes de la aplicación de los tratamientos, las plantas de chile serrano se regaron con abundante agua corriente, y el exceso de agua del contenedor base se eliminó para evitar contaminación cruzada. Se aplicaron, de manera independiente, 10 mL del SNC de las actinobacterias ABV38, ABV39 y ABV45 por cada planta de chile de 25 días de edad. Como testigo negativo se aplicaron 10 mL de agua destilada estéril por planta, y como testigo químico se utilizó el producto comercial Infinito® (Bayer®, México), recomendado para el control de oomicetos, el cual contiene fluopicolide (62.5 g·L⁻¹) y propamocarb clorhidrato (625 g·L⁻¹). Para el testigo químico, se preparó una suspensión a 3 mL·L⁻¹ del producto concentrado y se agregaron 10 mL por planta. Después de la aplicación de los tratamientos, cada planta se inoculó con 3 mL de la suspensión de zoosporas (500 zoosporas·mL⁻¹) de PC CH11, a una concentración final en el sustrato de 50 zoosporas·g⁻¹. Las plantas testigo se inocularon con 3 mL de agua destilada estéril. Después de la inoculación del oomiceto fitopatógeno, las plantas se incubaron a 21 ± 1 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) durante 10 días. No se aplicaron más riegos a las plantas.

Para esta prueba, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 tratamientos: T1) ABV38, T2) ABV38 + PC CH11, T3) ABV39, T4) ABV39 + PC CH11, T5) ABV45, T6) ABV45 + PC CH11, T7) testigo (plantas sanas), T8) testigo + PC CH11 (plantas enfermas), T9) testigo químico y T10) testigo químico

$$\text{Survival (\%)} = \frac{6 - \text{No. of dead plants}}{6} \times 100$$

Molecular identification of actinobacterium strains

Actinobacterial isolates ABV38, ABV39 and ABV45 were identified by partial amplification of the 16S rRNA gene by means of polymerase chain reaction (PCR), for which the oligonucleotides fD1(5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rD1 (5'-CCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991) were used. DNA extraction, PCR and sequencing of the amplified fragments were performed at the Biotechnology and Seed Pathology Laboratory of the Colegio de Postgraduados. The amplified fragments were sequenced in both directions using primers 8F, 1492R, U514, 800R, fD1 and rD1 (Edwards, Rogall, Blockerl, Emde, & Bottger, 1989; Stackebrandt & Liesack, 1993).

Consensus sequences of strains ABV38, ABV39 and ABV45 were compared in the GenBank/EMBL/DDBJ database through the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program (McGinnis & Madden, 2004). Reference sequences and those of phylogenetically-related strains were used with each actinobacterium. The sequences were aligned with CLUSTAL W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) and the phylogenetic tree construction was performed by means of the Neighbor-Joining (NJ) method (Saitou & Nei, 1987) with 1,000 Bootstrap replicates using the MEGA-X program (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). The nucleotide substitution model selected for NJ was Kimura-2 parameters (Kimura, 1980). The partial 16S rRNA gene sequences of strains ABV38, ABV39 and ABV45 were deposited in the GenBank database under accession numbers MT435538, MT435539 and MT435540, respectively.

Statistical analysis

The response variables (inhibition and survival percentage) were subjected to analysis of variance and Tukey's mean comparison test ($P \leq 0.05$), for which the StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005) statistical package was used. The survival percentage data were transformed with $\text{ArcSen}\sqrt{x}$ prior to analysis.

Results

In vitro antagonistic activity

Strains ABV38, ABV39 and ABV45 had different degrees of *in vitro* growth inhibition of PC CH11 (Figure 1). Pre-incubation (5 days) of strains ABV38, ABV39 and ABV45 showed significant differences ($P \leq 0.05$) in PC CH11 growth inhibition (with an increase of 14.9, 10.4

+ PC CH11. Los tratamientos se aplicaron en charolas con las plantas de chile. Una charola contaba con 12 columnas, cada una con seis plantas de chile. Se excluyeron las columnas extremas de la charola. Las 10 columnas internas se aleatorizaron para aplicar los tratamientos. La unidad experimental constó de seis plantas de chile, y los tratamientos se realizaron por triplicado. El porcentaje de supervivencia de las plantas se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{6 - \text{núm. de plantas muertas}}{6} \times 100$$

Identificación molecular de las cepas de actinobacterias

La identificación de los aislados actinobacterianos ABV38, ABV39 y ABV45 se realizó mediante la amplificación parcial del gen ARNr 16S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para ello se utilizaron los oligonucleótidos fD1(5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-CCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg, Barns, Pelletier, & Lane, 1991). La extracción del ADN, la PCR y la secuenciación de los fragmentos amplificados se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Colegio de Postgraduados. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en ambos sentidos utilizando los iniciadores 8F, 1492R, U514, 800R, fD1 y rD1 (Edwards, Rogall, Blockerl, Emde, & Bottger, 1989; Stackebrandt & Liesack, 1993).

Las secuencias consenso de las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 se compararon en la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ a través del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (McGinnis & Madden, 2004). Se utilizaron las secuencias de referencia y de cepas tipo filogenéticamente relacionadas con cada actinobacteria. Las secuencias se alinearon con CLUSTAL W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) y la construcción del árbol filogenético se realizó mediante el método Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) con 1,000 repeticiones Bootstrap utilizando el programa MEGA-X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018). El modelo de sustitución de nucleótidos seleccionado para NJ fue Kimura-2 parámetros (Kimura, 1980). Las secuencias parciales del gen ARNr 16S de las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 se depositaron en la base de datos del GenBank bajo los números de accesión MT435538, MT435539 y MT435540, respectivamente.

Análisis estadístico

Las variables respuesta (porcentaje de inhibición y de supervivencia) se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey

and 9 %, respectively) compared to treatments without pre-incubation (Figure 1). Strain ABV39 showed the lowest reduction (28 %) of PC CH11 mycelial growth at 5 days of pre-incubation, while strains ABV38 and ABV45 had an inhibition percentage of 51 and 50 %, respectively, at the same pre-incubation time (Figure 1 and 2). Results of the *in vitro* antagonistic activity clearly indicate the potential of strains ABV38 and ABV45 as biological control agents of PC CH11, by presenting significant differences in the inhibition of mycelial growth of this plant pathogen with respect to strain ABV39 at any pre-incubation time (Figure 1 and 2).

Biorational control of *P. capsici* CH11 *in vivo*

Table 1 presents the survival percentage of serrano pepper plants in the different treatments. Results indicate that the BCS of strains ABV45 (T6; 94 %), ABV38 (T2; 77 %) and the chemical control (T10; 100 %), applied

($P \leq 0.05$), para lo cual se empleó el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005). Los datos de porcentaje de supervivencia se transformaron con $ArcSen\sqrt{x}$ previo a su análisis.

Resultados

Actividad antagonística *in vitro*

Las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 presentaron diferente grado de inhibición del crecimiento *in vitro* de PC CH11 (Figura 1). La pre-incubación (5 días) de las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la inhibición del crecimiento de PC CH11 (con un incremento de 14.9, 10.4 y 9 %, respectivamente), en comparación con los tratamientos sin pre-incubación (Figura 1). La cepa ABV39 mostró la menor reducción (28 %) del crecimiento micelial de PC CH11 a los 5 días de pre-incubación, mientras que

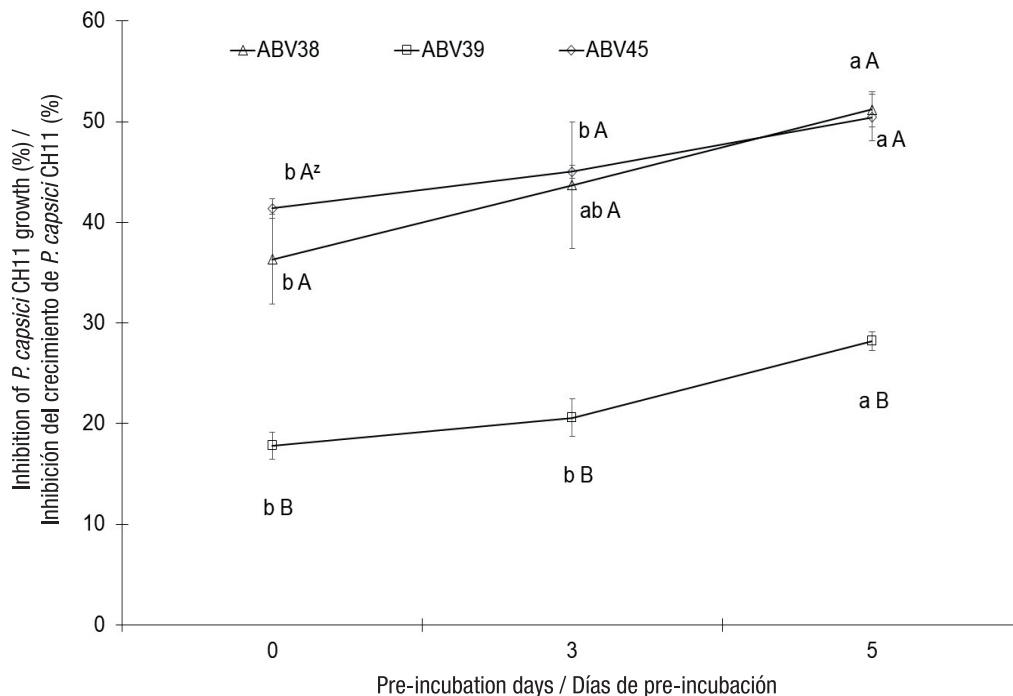


Figure 1. Behavior of the *in vitro* growth inhibition ability of *Phytophthora capsici* CH11 by different strains of *Streptomyces* spp. (mean \pm standard deviation). ^zMeans with the same letter within pre-incubation time (lowercase) or by strains (uppercase) do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 1. Comportamiento de la capacidad de inhibición del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora capsici* CH11 por distintas cepas de *Streptomyces* spp. (media \pm desviación estándar). ^zMedias con la misma letra entre tiempo de pre-incubación (minúscula) o por cepas (mayúscula) no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

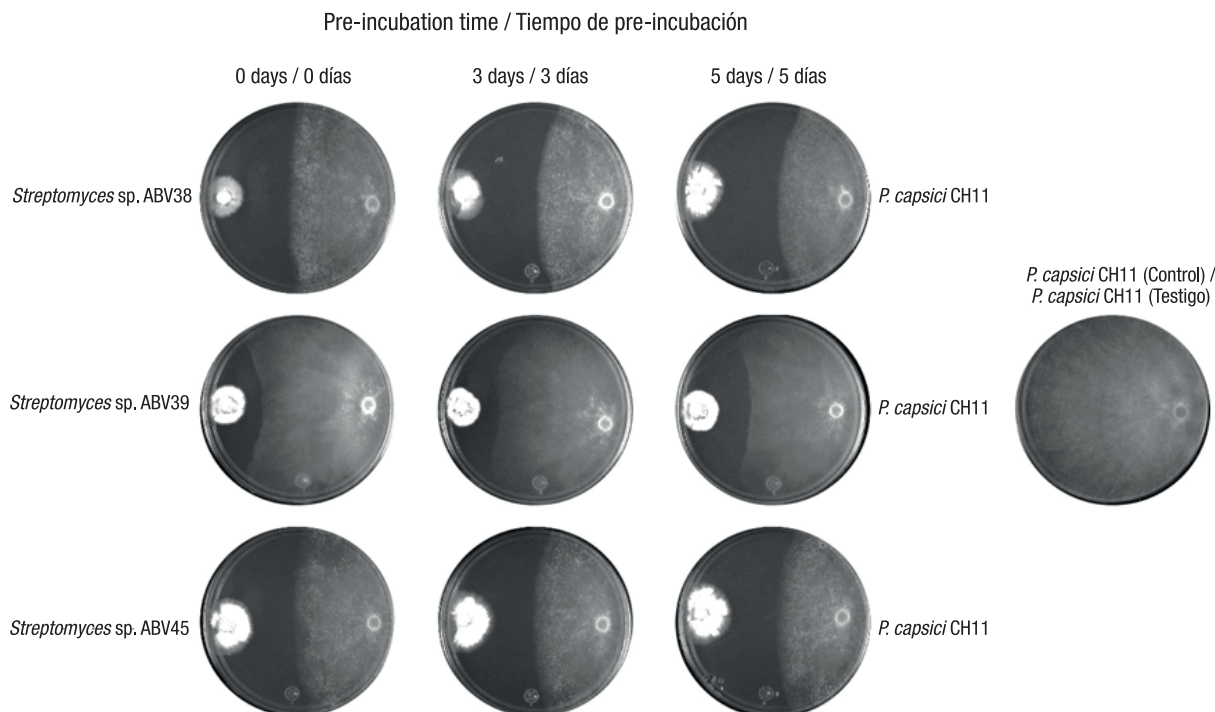


Figure 2. *In vitro* antagonistic activity of different strains of *Streptomyces* spp. against *Phytophthora capsici* CH11.
Figura 2. Actividad antagonica *in vitro* de diferentes cepas de *Streptomyces* spp. contra *Phytophthora capsici* CH11.

to pepper plants inoculated with PC CH11, showed significant differences in the survival percentage compared to the control (T8; 0 %). Plants treated with the BCS of strain ABV39 (T4; 0 %) did not show a control effect of PC CH11.

The *in vivo* experiment showed that applying the BCS of strains ABV38 and ABV45 had a suppressive effect on the wilting of pepper plants caused by PC CH11, while in the control treatment inoculated with PC CH11, severe defoliation and wilting was observed 10 days after inoculation with the phytopathogenic oomycete (Figure 3). The application of the BCS of the actinobacteria did not affect the survival of pepper seedlings not inoculated with PC CH11 (Table 1); however, a decrease in root length was observed due to the application of the broth culture (Figure 3).

Molecular identification

Comparative analysis of the 16S rRNA gene sequences of actinobacterial strains ABV38 (1,404 bp), ABV39 (1,403 bp) and ABV45 (1,231 bp) confirmed that all three strains belong to the genus *Streptomyces* (Figure 4). Analysis of these sequences indicated that strains ABV38, ABV39 and ABV45 are phylogenetically related to *S. thioluteus* NBRC 13341 (99.36 %), *S. galbus* DSM 40480 (99.29 %) and *S. cinnamoneus* NBRC 15926 (99.76 %), respectively. However, further studies are needed to establish whether strains ABV38, ABV39 and ABV45 represent new species for the genus *Streptomyces*.

las cepas ABV38 y ABV45 presentaron un porcentaje de inhibición de 51 y 50 %, respectivamente, en el mismo tiempo de pre-incubación (Figura 1 y 2). Los resultados de la actividad antagonica *in vitro* indican claramente el potencial de las cepas ABV38 y ABV45 como agentes de control biológico de PC CH11, al presentar diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial de dicho fitopatógeno con respecto a la cepa ABV39 en cualquier tiempo de pre-incubación (Figura 1 y 2).

Control biorracional de *P. capsici* CH11 *in vivo*

El Cuadro 1 presenta el porcentaje de supervivencia de las plantas de chile serrano en los distintos tratamientos. Los resultados indican que el SNC de las cepas ABV45 (T6; 94 %), ABV38 (T2; 77 %) y el testigo químico (T10; 100 %), aplicados a plantas de chile inoculadas con PC CH11, mostraron diferencias significativas en el porcentaje de supervivencia respecto del testigo (T8; 0 %). Las plantas tratadas con el SNC de la cepa ABV39 (T4; 0 %) no mostraron un efecto de control de PC CH11.

El experimento *in vivo* demostró que la aplicación del SNC de las cepas ABV38 y ABV45 tuvo un efecto supresor de la marchitez en las plantas de chile causada por PC CH11, mientras que en el tratamiento testigo inoculado con PC CH11 se observó una severa defoliación y marchitez a los 10 días después de inocular al oomiceto fitopatógeno (Figura 3). La aplicación del SNC de las actinobacterias no afectó la supervivencia

Table 1. Effect of the application of the broth culture supernatant of actinobacterias on the survival percentage of serrano pepper var. Camino Real plants 10 days after inoculation with *Phytophthora capsici* CH11.

Cuadro 1. Efecto de la aplicación del sobrenadante del caldo de cultivo de actinobacterias sobre el porcentaje de supervivencia de plantas de chile serrano var. Camino Real a los 10 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici* CH11.

Treatment / Tratamiento	Survival (%) / Supervivencia (%)
T1) <i>Streptomyces</i> sp. ABV38	100 a ^z
T2) <i>Streptomyces</i> sp. ABV38 + <i>P. capsici</i> CH11	77 b
T3) <i>Streptomyces</i> sp. ABV39	100 a
T4) <i>Streptomyces</i> sp. ABV39 + <i>P. capsici</i> CH11	0 c
T5) <i>Streptomyces</i> sp. ABV45	100 a
T6) <i>Streptomyces</i> sp. ABV45 + <i>P. capsici</i> CH11	94 a
T7) Control (healthy plants) / T7) Testigo (plantas sanas)	100 a
T8) Control + <i>P. capsici</i> CH11 (diseased plants) / T8) Testigo + <i>P. capsici</i> CH11 (plantas enfermas)	0 c
T9) Chemical control / T9) Testigo químico	100 a
T10) Chemical control + <i>P. capsici</i> CH11 / T10) Testigo químico + <i>P. capsici</i> CH11	100 a

^zMeans with the same letter do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

^zMedias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

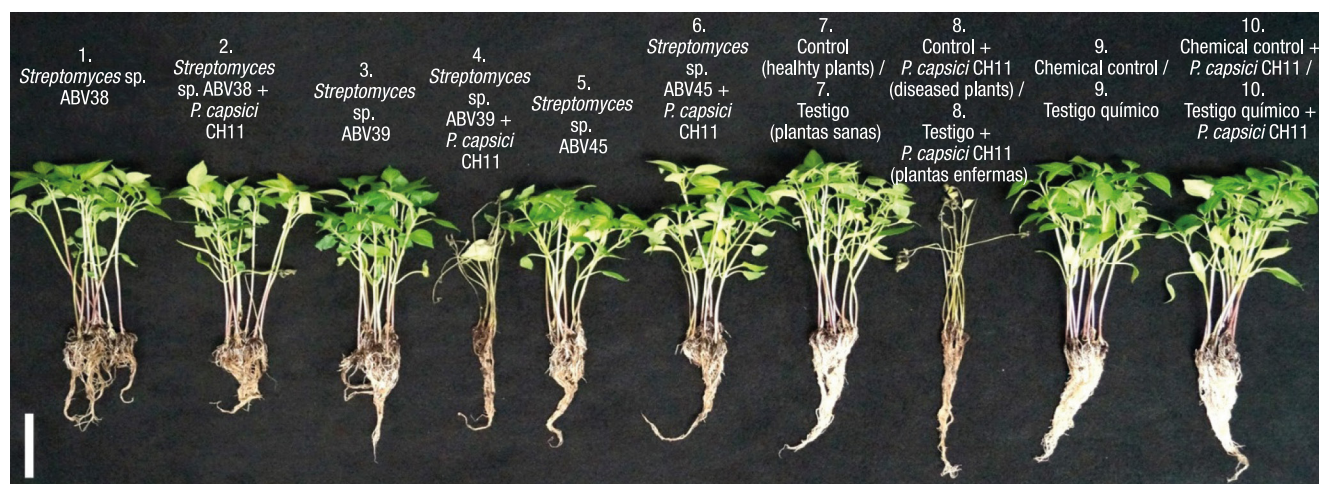


Figure 3. Biorational control of wilt in serrano pepper var. Camino Real plants by actinobacteria 10 days after inoculation with *Phytophthora capsici* CH11. Bar = 5 cm.

Figura 3. Control biorracional de marchitez en plantas de chile serrano var. Camino Real mediante actinobacterias a los 10 días después de la inoculación con *Phytophthora capsici* CH11. Barra = 5 cm.

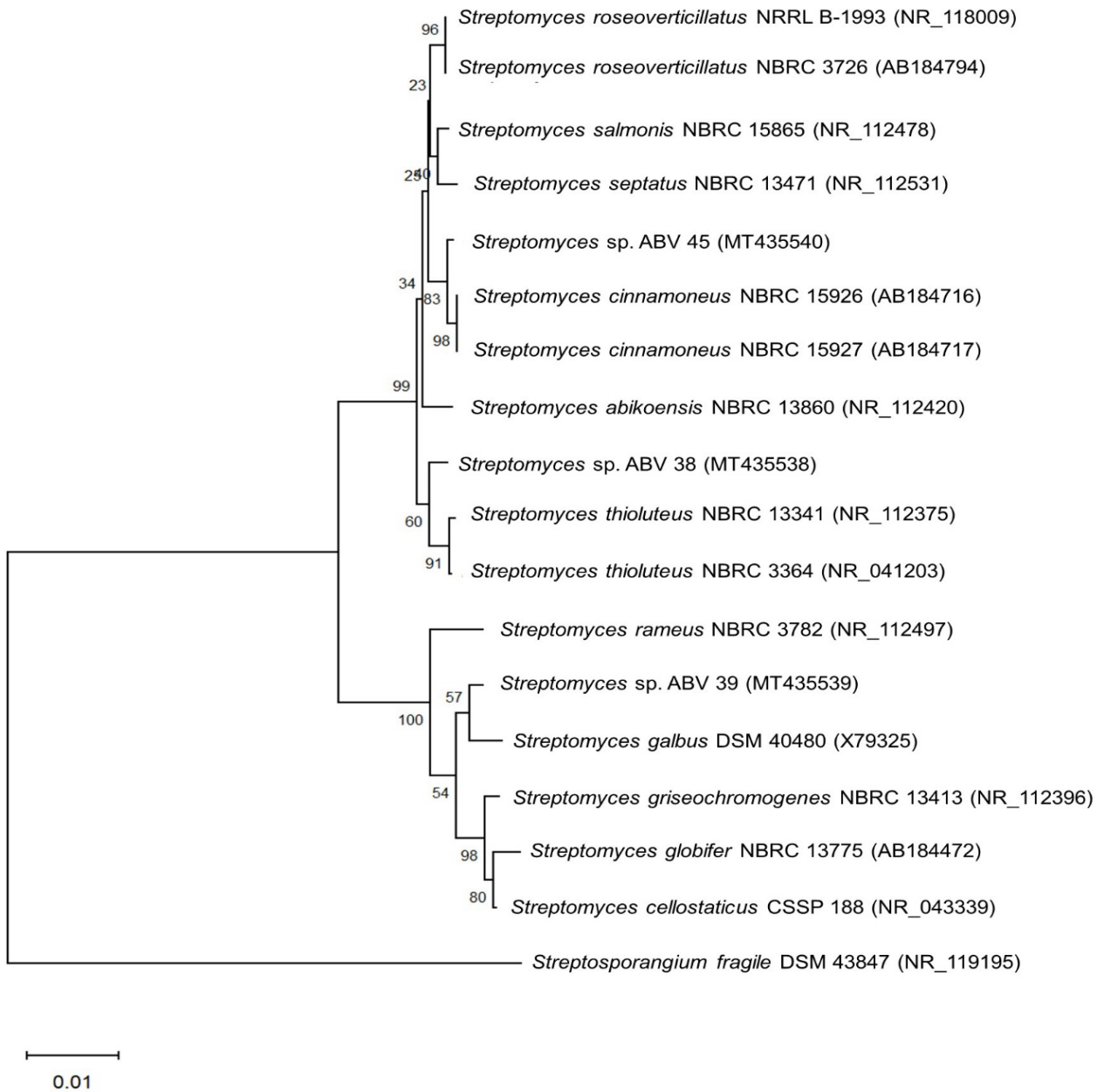


Figure 4. Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between strains ABV38, ABV39 and ABV45 with other species of the genus *Streptomyces*. The numbers beside the branches are Bootstrap values (%). The sequence of *Streptosporangium fragile* DSM 43847 was used as an outgroup. The accession number of each sequence is shown in parentheses. Bar = 0.01 substitutions per nucleotide position.

Figura 4. Árbol filogenético Neighbor-Joining basado en secuencias parciales del gen ARNr 16S que muestra las relaciones filogenéticas entre las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 con otras especies del género *Streptomyces*. Los números a un lado de las ramas son valores Bootstrap (%). La secuencia de *Streptosporangium fragile* DSM 43847 se utilizó como grupo externo. El número de accesión de cada secuencia se muestra entre paréntesis. Barra = 0.01 sustituciones por posición de nucleótido.

Discussion

The genus *Streptomyces* is a potential source of biocontrol agents against *Phytophthora* spp. (Arfaoui et al., 2018; Sadeghi et al., 2017; Thampi & Bhai, 2017). In the present study, the antagonistic activity of three *Streptomyces* strains against PC was examined under *in vitro* and *in vivo* conditions. Under *in vitro* conditions, strains ABV38 and ABV45 showed the ability to inhibit mycelial growth of PC CH11 in direct confrontation, whereas strain ABV39 exhibited weak activity. Secondary metabolites with antioomycete activity could be involved in mechanisms inhibiting PC mycelial growth.

Chen et al. (2016) report that the fermented broth of *S. plicatus* B4-7 (cell-free) cultured in oatmeal broth inhibited mycelial growth of *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. palmivora*, and *P. parasitica* by 55, 65, 43.8, and 35 %, respectively. Yang, Zhang, and Li (2019) note that metabolites from the ethanolic extract of the fermented broth of *S. corchorusii* AUH-1 inhibited the mycelial growth of *P. capsici* and *P. parasitica* var. *nicotianae* by 67.2 and 78.9 %, respectively. In this study, *Streptomyces* sp. ABV38 and ABV45 exhibited inhibition percentages of 51 and 50 %, respectively, on PC mycelial growth. However, further studies are required to determine which metabolite(s) are involved in the inhibition of *P. capsici* and their mode of action.

During *in vivo* evaluation of the BCS of strains ABV38 and ABV45, applied to pepper plants, the broth showed a suppressive effect on wilt caused by PC CH11. In studies with *Streptomyces* spp., Nguyen et al. (2012) showed that the culture supernatant of *S. griseus* H7602 reduced the wilt of pepper roots inoculated with PC, and in subsequent studies they demonstrated that the antioomycete activity was due to pyrrolidone carboxylic acid (Nguyen et al., 2015). Chen et al. (2016) demonstrated that the fermented broth obtained from the growth of *S. plicatus* B4-7 completely inhibited *in vitro* germination of PC zoospores and reduced crown rot disease by 75 % in bell pepper plants inoculated with PC zoospores. In this case, the compound purified from the culture broth with the highest antioomycete activity was borrelidin. Sellem et al. (2017) found that the supernatant from the lyophilized culture of *Streptomyces* sp. TN258 completely inhibited the germination of *P. ultimum* oospores at a concentration of 12.5 mg·mL⁻¹.

Regarding secondary metabolites, Lee, Sherman, and Hwang (2008) found that thiobutacin, isolated from *L. aerocolonigenes* VK-A9, exhibited the lysis of PC zoospores. Islam, Laatsch, and von Tiedemann (2016) observed the zoosporicidal activity of macrotetrolide dinactin isolated from *Streptomyces* sp., as it halted motility and caused the subsequent lysis of zoospores

de las plántulas de Chile no inoculadas con PC CH11 (Cuadro 1); sin embargo, se observó una disminución de la longitud de las raíces debido a la aplicación del caldo de cultivo (Figura 3).

Identificación molecular

El análisis comparativo de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas de actinobacteria ABV38 (1,404 pb), ABV39 (1,403 pb) y ABV45 (1,231 pb) confirmó que las tres cepas pertenecen al género *Streptomyces* (Figura 4). El análisis de dichas secuencias indicó que las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 están filogenéticamente relacionadas con *S. thioluteus* NBRC 13341 (99.36 %), *S. galbus* DSM 40480 (99.29 %) y *S. cinnamomeus* NBRC 15926 (99.76 %), respectivamente. No obstante, se necesitan otros estudios para establecer si las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 representan nuevas especies para el género *Streptomyces*.

Discusión

El género *Streptomyces* es una fuente potencial de agentes de biocontrol contra *Phytophthora* spp. (Arfaoui et al., 2018; Sadeghi et al., 2017; Thampi & Bhai, 2017). En el presente estudio, se examinó la actividad antagónica de tres cepas de *Streptomyces* contra PC en condiciones *in vitro* e *in vivo*. En condiciones *in vitro*, las cepas ABV38 y ABV45 mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de PC CH11 en confrontación directa, mientras que la cepa ABV39 presentó una actividad débil. Metabolitos secundarios con actividad antioomyceto podrían estar implicados en los mecanismos de inhibición del crecimiento micelial de PC.

Chen et al. (2016) reportan que el caldo fermentado de *S. plicatus* B4-7 (libre de células), cultivado en caldo de avena, inhibió el crecimiento micelial de *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. palmivora* y *P. parasitica* en un 55, 65, 43.8 y 35 %, respectivamente. Yang, Zhang, y Li (2019) mencionan que los metabolitos del extracto etanólico del caldo fermentado de *S. corchorusii* AUH-1 inhibieron el crecimiento micelial de *P. capsici* y *P. parasitica* var. *nicotianae* en un 67.2 y 78.9 %, respectivamente. En este estudio, *Streptomyces* sp. ABV38 y ABV45 exhibieron porcentajes de inhibición de 51 y 50 %, respectivamente, en el crecimiento micelial de PC. No obstante, se requieren estudios posteriores para determinar qué metabolito o metabolitos están implicados en la inhibición de *P. capsici* y su modo de acción.

Durante la evaluación *in vivo* del SNC de las cepas ABV38 y ABV45, aplicado a plantas de Chile, el caldo mostró un efecto supresor de la marchitez causada por PC CH11. En estudios con *Streptomyces* spp., Nguyen et al. (2012) mostraron que el sobrenadante del cultivo de

of both *P. capsici* and the phytopathogenic oomycete *Plasmopara viticola*. Abdalla et al. (2011) isolated and purified compounds from the culture broth of *Streptomyces* sp. ANK313, a new one (khatmiamycin) and others already known, which inhibited motility and caused lysis of *P. viticola* zoospores.

In this study, the BCS of *Streptomyces* sp. strains ABV38 and ABV45 suppressed wilt of pepper plants when inoculated with PC CH11 zoospores. *In vivo* test results suggest that secondary metabolites of BCSs could be involved in controlling the disease by acting directly against zoospores. Further studies are needed to identify which BCS compound(s) are involved in suppressing wilt caused by PC.

On the other hand, the commercial product Infinito®, used as a chemical control, exhibited 100 % control over PC CH11 as the pepper plants showed no evidence of wilt 10 days after inoculation. In *in vitro* studies, fluopicolide and propamocarb hydrochloride have been shown to have an effect on the reduction of mycelial growth, sporangium formation, zoospore motility and germination at different stages of *Phytophthora* spp. development (Hu, Hong, Stromberg, & Moorman, 2007; Toquin, Latorse, & Beffa, 2019).

Although the BC of *Streptomyces* sp. ABV39 did not exhibit a wilt-suppressing effect on PC CH11, in previous studies, co-inoculation of poblano pepper plants with *Streptomyces* sp. ABV39 spores and arbuscular mycorrhizal fungi reduced wilt severity relative to the PC-inoculated control (Reyes-Tena, Rincón-Enríquez, López-Pérez, & Quiñones-Aguilar, 2017). The results suggest that *Streptomyces* sp. ABV39 is not useful for biorational control of PC; however, it could be used as a biocontrol agent.

Conclusions

Streptomyces sp. strains ABV38, ABV39 and ABV45 showed different degrees of control over *in vitro* growth of *P. capsici* CH11 depending on incubation time. The 5-day pre-incubation of the three strains significantly increased the growth inhibition of *P. capsici* CH11. *In vivo* evaluation showed biorational control of the culture supernatant of strains ABV38 and ABV45 in the suppression of wilt caused by *P. capsici* CH11 in pepper plants under controlled conditions. Molecular identification of strains ABV38, ABV39 and ABV45 indicated that they belong to the genus *Streptomyces*. Overall, strains ABV38 and ABV45 have potential for biorational control of pepper wilt.

Acknowledgements

The authors thank the Joint CONACYT-Government of the State of Aguascalientes Fund for funding the

S. griseus H7602 redujo la marchitez de las raíces de chile inoculadas con PC, y en estudios posteriores demostraron que la actividad antioomiceto se debió al ácido pirrolidón carboxílico (Nguyen et al. 2015). Chen et al. (2016) demostraron que el caldo fermentado obtenido del crecimiento de *S. plicatus* B4-7 inhibió completamente la germinación *in vitro* de zoosporas de PC y redujo en un 75 % la enfermedad de la pudrición de la corona en plantas de pimiento morrón inoculadas con zoosporas de PC. En este caso, el compuesto purificado del caldo de cultivo con mayor actividad antioomiceto fue la borrelidina. Sellem et al. (2017) encontraron que el sobrenadante del cultivo liofilizado de *Streptomyces* sp. TN258 inhibió completamente la germinación de oosporas de *P. ultimum* a una concentración de 12.5 mg·mL⁻¹.

En cuanto a los metabolitos secundarios, Lee, Sherman, y Hwang (2008) encontraron que la tiobutacina, aislada de *L. aerocolonigenes* VK-A9, exhibió la lisis de zoosporas de PC. Islam, Laatsch, y von Tiedemann (2016) observaron la actividad zoosporicida del macrotetrolido dinactina aislado de *Streptomyces* sp., ya que detuvo la motilidad y causó la subsecuente lisis de zoosporas de *P. capsici* y del oomiceto fitopatógeno *Plasmopara viticola*. Abdalla et al. (2011) aislaron y purificaron compuestos del caldo de cultivo de *Streptomyces* sp. ANK313, uno nuevo (khatmiamicina) y otros ya conocidos, los cuales inhibieron la motilidad y ocasionaron la lisis de las zoosporas de *P. viticola*.

En este estudio, el SNC de las cepas de *Streptomyces* sp. ABV38 y ABV45 suprimió la marchitez de las plantas de chile cuando se inocularon con zoosporas de PC CH11. Los resultados de la prueba *in vivo* sugieren que los metabolitos secundarios de los SNC podrían estar implicados en el control de la enfermedad al actuar directamente contra las zoosporas. Estudios posteriores son necesarios para identificar qué compuesto o compuestos del SNC están implicados en la supresión de la marchitez causada por PC.

Por otra parte, el producto comercial Infinito®, utilizado como control químico, exhibió un 100 % de control sobre PC CH11 al no presentar plantas de chile con marchitez a los 10 días después de la inoculación. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el fluopicolide y el propamocarb clorhidrato tienen efecto en la reducción del crecimiento micelial, la formación de esporangios, la motilidad de las zoosporas y su germinación en las distintas etapas de desarrollo de *Phytophthora* spp. (Hu, Hong, Stromberg, & Moorman, 2007; Toquin, Latorse, & Beffa, 2019).

A pesar de que el SNC de *Streptomyces* sp. ABV39 no exhibió un efecto supresor de la marchitez de PC CH11, en estudios previos, la co-inoculación de plantas de chile poblano con esporas de *Streptomyces* sp.

project entitled “Development of a technology for the biological control of pepper wilt by means of actinomycetes native to the State of Aguascalientes” (AGS-2011-C02-181930), and Dr. Sylvia Patricia Fernández Pavía of the IIAF-UMSNH Plant Pathology Laboratory for kindly providing the *Phytophthora capsici* CH11 strain. The first author is grateful to CONACYT for the grant awarded for his doctoral studies (CVU 424465), and to the Joint CONACYT-Government of the State of Aguascalientes Fund for the support to participate in the project.

End of English version

References / Referencias

- Abdalla, M. A., Win, H. Y., Islam, M. T., von Tiedemann, A., Schüffler, A., & Laatsch, H. (2011). Khatmiamycin, a motility inhibitor and zoosporeicide against the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* from *Streptomyces* sp. ANK313. *The Journal of Antibiotics*, 64(10), 655-659. doi: 10.1038/ja.2011.68
- Arfaoui, A., Adam, L. R., Bezzahou, A., & Daayf, F. (2018). Isolation and identification of cultivated bacteria associated with soybeans and their biocontrol activity against *Phytophthora sojae*. *BioControl*, 63(4), 607-617. doi: 10.1007/s10526-018-9873-9
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 65, 385-395. doi: 10.1038/ja.2012.27
- Chen, Y. Y., Chen, P. C., & Tsay, T. T. (2016). The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biological Control*, 98, 34-42. doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.02.011
- Drenth, A., & Guest, D. I. (2004). Biology of *Phytophthora*. In: Drenth, A., & Guest, D. I. (Eds.), *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia* (pp. 29-58). Canberra, Australia: ACIAR Monograph.
- Edwards, U., Rogall, T., Blockerl, H., Emde, M., & Bottger, E. C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7843-7853. doi: 10.1093/nar/17.19.7843
- Evangelista-Martínez, Z. (2014). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 1639-1647. doi: 10.1007/s11274-013-1568-x
- Fonseca-Ardila, Y. A., Castellanos-Suárez, D. E., & León-Sicard, T. E. (2011). Efecto antagónico *in vitro* de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(2), 6111-6119. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922664008>

ABV39 y hongos micorrízicos arbusculares redujeron la severidad de la marchitez con respecto al testigo inoculado con PC (Reyes-Tena, Rincón-Enríquez, López-Pérez, & Quiñones-Aguilar, 2017). Los resultados sugieren que *Streptomyces* sp. ABV39 no es útil para el control biorracional de PC; sin embargo, podría ser utilizado como agente de biocontrol.

Conclusiones

Las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 de *Streptomyces* sp. mostraron diferente grado de control sobre el crecimiento *in vitro* de *P. capsici* CH11 dependiente del tiempo de incubación. La pre-incubación de 5 días de las tres cepas incrementó significativamente la inhibición del crecimiento de *P. capsici* CH11. La evaluación *in vivo* mostró el control biorracional del sobrenadante del cultivo de las cepas ABV38 y ABV45 en la supresión de la marchitez causada por *P. capsici* CH11 en plantas de chile en condiciones controladas. La identificación molecular de las cepas ABV38, ABV39 y ABV45 indicó que pertenecen al género *Streptomyces*. En general, las cepas ABV38 y ABV45 poseen potencial para el control biorracional de la marchitez del chile.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Aguascalientes por el financiamiento del proyecto “Desarrollo de una tecnología para el control biológico de la marchitez del chile por medio de actinomicetos nativos del Estado de Aguascalientes” (AGS-2011-C02-181930), y a la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF-UMSNH por proveer amablemente la cepa de *Phytophthora capsici* CH11. El primer autor agradece al CONACYT por la beca otorgada para sus estudios de doctorado (CVU 424465), y al Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Aguascalientes por el apoyo para participar en el proyecto.

Fin de la versión en español

- Hu, J., Hong, C., Stromberg, E. L., & Moorman, G. W. (2007). Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease*, 91(4), 414-420. doi: 10.1094/PDIS-91-4-0414
- Islam, M. T., Laatsch, H., & vonTiedemann, A. (2016). Inhibitory effects of macrotetrolides from *Streptomyces* spp. on zoosporegenesis and motility of peronosporomycete zoospores are likely linked with enhanced ATPase activity in mitochondria. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1824. doi: 10.3389/fmicb.2016.01824
- Joo, G. J. (2005). Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters*, 27(3), 201-205. doi: 10.1007/s10529-004-7879-0
- Judelson, H. S., & Blanco, F. A. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 47-58. doi: 10.1038/nrmicro1064
- Jung, T., Pérez-Sierra, A., Durán, A., Jung, M. H., Balci, Y., & Scanu, B. (2018). Canker and decline diseases caused by soil- and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands. *Persoonia*, 40, 182-220. doi: 10.3767/persoonia.2018.40.08
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120. doi: 10.1007/BF01731581
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kurth, F., Mailänder, S., Bönn, M., Feldhahn, L., Herrmann, S., Große, I., Buscot, F., Schrey, S. D., & Tarkka, M. T. (2014). *Streptomyces*-induced resistance against oak powdery mildew involves host plant responses in defense, photosynthesis, and secondary metabolism pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 891-900. doi: 10.1094/MPMI-10-13-0296-R
- Lamichhane, J. R., Dürr, C., Schwanck, A. A., Robin, M. H., Sarthou, J. P., Cellier, V., ... Aubertot, J. N. (2017). Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37, 10. doi: 10.1007/s13593-017-0417-y
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329-337. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x
- Lee, J. Y., Moon, S. S., Yun, B. S., Yoo, I. D., & Hwang, B. K. (2004). Thiobutacin, a novel antifungal and antioomycete antibiotic from *Lechevalieria aerocolonigenes*. *Journal of Natural Products*, 67(12), 2076-2078. doi: 10.1021/np049786v
- Lee, J. Y., Sherman, D. H., & Hwang, B. K. (2008). *In vitro* antimicrobial and *in vivo* antioomycete activities of the novel antibiotic thiobutacin. *Pest Management Science*, 64(2), 172-177. doi: 10.1002/ps.1494
- McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 32, 20-25. doi: 10.1093/nar/gkh435
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Kim, Y. H., Moon, J. H., & Kim, K. Y. (2015). Antagonism of antifungal metabolites from *Streptomyces griseus* H7602 against *Phytophthora capsici*. *Journal of Basic Microbiology*, 55(1), 45-53. doi: 10.1002/jobm.201300820
- Nguyen, X. H., Naing, K. W., Lee, Y. S., Tindwa, H., Lee, G. H., Jeong, B. K., ... Kim, K. Y. (2012). Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. *The Plant Pathology Journal*, 28(3), 282-289. doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2012.0040
- O'Brien, P. A. (2017). Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46(4), 293-304. doi: 10.1007/s13313-017-0481-4
- Reyes-Tena, A., Fernández-Pavia, S., Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L., & Quiñones-Aguilar, E. (2014). Selección de actinomicetos antagonistas a diferentes cepas de *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, S53. Retrieved from http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen322014/Integrado/SUPLEMENTOINTEGRADO_32_2014.pdf
- Reyes-Tena, A., Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L., & Quiñones-Aguilar, E. E. (2017). Effect of mycorrhizae and actinomycetes on growth and bioprotection of *Capsicum annum* L. against *Phytophthora capsici*. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 54(3), 513-522. doi: 10.21162/PAKJAS/17.4245
- Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L., & Quiñones-Aguilar, E. E. (2014). Efectividad biológica *in vitro* de actinomicetos sobre el agente causal del tizón de halo en frijol. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(3), 229-234. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v37n3/v37n3a8.pdf>
- Ristaino, J. B. (1990). Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. *Phytopathology*, 80(11), 1253-1259. doi: 10.1094/Phyto-80-1253
- Sadeghi, A., Koobaz, P., Azimi, H., Karimi, E., & Akbari, A. R. (2017). Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. *BioControl*, 62(6), 805-819. doi: 10.1007/s10526-017-9838-4
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Sellem, I., Triki, M. A., Elleuch, L., Cheffi, M., Chakchouk, A., Smaoui, S., & Mellouli, L. (2017). The use of newly isolated *Streptomyces* strain TN258 as potential biocontrol agent of potato tubers leak caused by *Pythium ultimum*. *Journal of Basic Microbiology*, 57(5), 393-401. doi: 10.1002/jobm.201600604
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). *Panorama agroalimentario 2019*.

- Mexico: Author. Retrieved from https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019
- Sharma, V., & Salwan, R. (2018). Biocontrol potential and applications of actinobacteria in agriculture. In: Singh, B. P., Gupta, V. K., & Passari, A. K. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 93-108). India: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00006-0
- Stackebrandt, E., & Liesack, W. (1993). Nucleic acids and classification. In: Goodfellow, M., & O'Donnell, A. G. (Eds.), *Handbook of New Bacterial Systematics* (pp. 152-189). USA: Academic Press. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?redir_esc=y&hl=es&id=pmYXAQAIAAJ&focus=searchwithinvolume&q=1492
- Stanghellini, M. E., Kim, D. H., Rasmussen, S. L., & Rorabaugh, P. A. (1996). Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant. *Plant Disease*, 80(10), 1113-1116. doi: 10.1094/PD-80-1113
- StatPoint Inc. (2005). *User Manual: StatGraphics Centurion, ver. XV*. Virginia, USA: Author. Retrieved from www.statgraphics.com
- Thampi, A., & Bhai, R. S. (2017). Rhizosphere actinobacteria for combating *Phytophthora capsici* and *Sclerotium rolfsii*, the major soil borne pathogens of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Biological Control*, 109, 1-13. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.03.006
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- Toquin, V., Latorse, M. P., & Beffa, R. (2019). Fluopicolide: a new anti-oomycete fungicide. In: Jeschke, P., Witschel, M., Krämer, W., & Schirmer, U. (Eds.), *Modern Crop Protection Compounds* (pp. 871-878). USA: John Wiley & Sons, Inc. doi: 10.1002/9783527699261.ch21
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- Wu, J., Xue, Z., Miao, J., Zhang, F., Gao, X., & Liu, X. (2020). Sensitivity of different developmental stages and resistance risk assessment of *Phytophthora capsici* to fluopicolide in China. *Frontiers in Microbiology*, 11, 185. doi: 10.3389/fmicb.2020.00185
- Yan, Y., Zhang, S., & Li, K. (2019). Antagonistic activity and mechanism of an isolated *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 145. doi: 10.1007/s11274-019-2720-z

