



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA Y NEGOCIOS SAN QUINTÍN**



**EFECTO ANTAGONISTA DE CEPAS DE *Streptomyces* sp SOBRE  
*Fusarium kuroshium* Y SU PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN  
*Arabidopsis thaliana***

**Como requisito parcial para obtener el título de  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**Por:**

**C. DANIEL SANCHEZ ARIAS**

**San Quintín, B.C. Septiembre de 2024**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y NEGOCIOS SAN QUINTÍN  
CAMPUS ENSENADA



“Efecto antagonista de cepas de *Streptomyces* sp sobre *Fusarium kuroshium* y su promoción del crecimiento en *Arabidopsis thaliana*”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE


**INGENIERO AGRÓNOMO**


PRESENTA

**DANIEL SANCHEZ ARIAS**  
**361370**


A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

  
JOSÉ GUADALUPE  
PEDROMÉNDEZ  
**DIRECTOR**

  
CLAUDIO RÍOS VELASCO  
**CODIRECTOR**

  
MARÍA FERNANDA RUIZ  
CISNEROS  
SINODAL

  
IMELDA VIRGINIA LOPEZ  
SANCHEZ  
SINODAL

  
SALVADOR ORDAZ SILVA  
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

## RESUMEN

La enfermedad conocida como marchitez regresiva por *Fusarium* causada por especies del hongo patógeno *Fusarium* (*F. euwallaceae* y *F. kuroshium*), recientemente detectada en México compromete la preservación de los recursos fitogenéticos. Cepas de *Streptomyces* ampliamente conocidos como excelentes agentes de biocontrol de fitopatógenos, podrían ser útiles para controlar exitosamente a este hongo patógeno mediante la producción de sustancias anti-fitopatogénicas, además de promover el crecimiento de las plantas. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la actividad de compuestos volátiles (COVs) y no volátiles de tres cepas de *Streptomyces* en la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium kuroshium*, y en la promoción del crecimiento *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Las cepas de *Streptomyces lactacystinicus* (IA07), *S. cellostaticus* (IA32) y *S. mauvecolor* (IA104) también se evaluaron en cuanto a su capacidad *in vitro* para producir sideróforos y ácido 3 indol-acético (AIA), así como la capacidad de solubilizar fosfatos. Las tres cepas de *Streptomyces*, mostraron inhibición del crecimiento directo *in vitro* de *F. kuroshium* superiores al 51%, similar a lo obtenido a través de volátiles con valores superiores al 58%, siendo *S. lactacystinicus* la cepa que mostró la mayor inhibición tanto por compuestos no volátiles como COVs. Las tres cepas de *Streptomyces* produjeron AIA y sideróforos. Los COVs de las tres cepas de *Streptomyces* incrementaron significativamente la longitud de raíces, el peso fresco de la planta y el peso fresco de las raíces en plántulas de *A. thaliana*. Los compuestos volátiles y no volátiles de las cepas de *Streptomyces* redujeron efectivamente el crecimiento *in vitro* de *F. kuroshium*. Estas cepas también favorecieron la acumulación de biomasa en *A. thaliana*. Por lo tanto, estas cepas podrían usarse exitosamente en el biocontrol de *F. kuroshium* y como biofertilizantes en cultivos hortofrutícolas. Sin embargo, se requieren más estudios para demostrar estas actividades en condiciones de campo abierto.

PALABRAS CLAVE: Biocontrol, *Streptomyces*, *Arabidopsis thaliana*, biomasa.

**ABSTRACT.** The disease known as Fusarium dieback caused by species of the pathogenic fungus *Fusarium* (*F. euwallaceae* and *F. kuroshium*), recently detected in Mexico, compromises the preservation of plant genetic resources. *Streptomyces* strains widely known as excellent biocontrol agents for phytopathogens, could be useful to successfully control this pathogenic fungus through the production of anti-phytopathogenic substances, in addition to promoting plant growth. The objectives of this study were to evaluate the activity of volatile (VOCs) and non-volatile compounds of three *Streptomyces* strains in inhibiting the *in vitro* growth of *Fusarium kuroshium*, and in promoting the *in vitro* growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings. Strains of *Streptomyces lactacystinicus* (IA07), *S. cellostaticus* (IA32), and *S. mauvecolor* (IA104) were also evaluated for their *in vitro* ability to produce siderophores and 3-indole-acetic acid (IAA) and solubilizing phosphates. The three *Streptomyces* strains showed direct *in vitro* growth inhibition of *F. kuroshium* > 51%, similar to that obtained through volatiles with values greater than 58%, with *S. lactacystinicus* being the strain that showed the greatest inhibition both by non-volatile compounds such as VOCs. All three *Streptomyces* strains produced IAA and siderophores. VOCs from the three *Streptomyces* strains significantly increased root length, plant fresh weight, and root fresh weight in *A. thaliana* seedlings. The VOCs and non-volatile compounds of the *Streptomyces* strains effectively reduced the *in vitro* growth of *F. kuroshium*. These strains also favored biomass accumulation in *A. thaliana*. Therefore, these strains could be used successfully in the biocontrol of *F. kuroshium* and as biofertilizers in horticultural crops. However, further studies are required to demonstrate these activities under open field conditions.

**KEYWORDS:** Biocontrol, *Streptomyces*, *Arabidopsis thaliana*, biomass.

La presente tesis de licenciatura titulada **EFFECTO ANTAGONISTA DE CEPAS DE *Streptomyces* sp SOBRE *Fusarium kuroshium* Y SU PROMOCION DEL CRECIMIENTO EN *Arabidopsis thaliana***, realizada por el **C. DANIEL SANCHEZ ARIAS**, bajo la dirección del M.P.A. José Guadalupe Pedro Méndez y la Co-dirección del Dr. Claudio Ríos Velasco, ha sido revisada y aprobada por el Comité Revisor, como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Estela R. Arias Villegas y Julián Sanchez Rojas, por apoyarme incondicionalmente a cumplir mi meta y de ellos verme concluir mi carrera universitaria, por acompañarme en cada paso para lograr ser un gran profesionalista, por todo el apoyo y por siempre creer en mí.

A mis hermanas Brenda B. Sanchez Arias y Alma D. Sanchez Arias quienes fueron parte de este proceso, por todo el apoyo y la comprensión que siempre tuvieron.

## AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto de Ciencia Básica-PRONACES 286806) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto y al PROYECTO FORDECYT - PRONACES (292399)-Programa Presupuestario F003.

Al CIAD por el apoyo brindado para la realización experimental del proyecto de investigación.

Esta tesis es parte del Proyecto “**Análisis transcriptómico diferencial de *Streptomyces con hongos y Oomicetos fitopatógenos***”. Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto de Ciencia Básica-PRONACES, 2018-2022, con clave 286806).

Quiero agradecer a mi familia por apoyarme en todo momento a cumplir una meta mas en mi vida profesional.

Fue un camino con grandes experiencias y aprendizajes, agradezco a la Universidad Autonoma de Baja California y a la Facultad de Ingenieria y Negocios San Quintin por permitir formarme profesionalmente y poder participar en diversas actividades que enriquecieron mi crecimiento personal y profesional.

Agradezco a mi director de tesis el M.P.A. José Guadalupe Pedro Méndez por tener la confianza y el apoyo para realizar este trabajo, aclarar toda las dudas y transmitir todo el conocimiento.

Al Dr. Claudio Ríos Velasco y a la Dra. María Fernanda Ruiz Cisneros por el apoyo y la confianza para la realización de esta investigación y para la revisión de este escrito, mi más sincero agradecimiento para ellos.

Al Dr. Salvador Ordaz Silva y a la M.P.A. Imelda Virginia López Sánchez por apoyarme en la investigación, en cada momento durante mi carrera universitaria, por toda la enseñanza que transmitieron y sobre todo la motivación para involucrarme en todas las actividades que aportaron a mi crecimiento.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO.</b>	<b>3</b>
Situación actual de los escarabajos ambrosiales.	3
<i>Euwallacea kuroshio</i>	3
Impactos de <i>Euwallacea kuroshio</i>	4
Clasificación taxonómica de <i>Euwallacea kuroshio</i>	5
Descripción morfológica de <i>Euwallacea kuroshio</i>	5
Ciclo de vida de <i>Euwallacea kuroshio</i>	6
Síntomas en hospederos	6
Rango de hospederos potenciales de <i>Euwallacea kuroshio</i> en México y el mundo	7
Marchitez regresiva por <i>Fusarium</i> o “Fusarium dieback (FD)	8
<i>Fusarium kuroshium</i>	10
Caracteres morfológicos de <i>Fusarium</i> spp.	11
Estrategias de control de <i>Fusarium kuroshium</i>	12
<b>Control químico</b>	12
<b>Control legal o normativo</b>	13
<b>Control cultural</b>	13
<b>Control físico</b>	14
<b>Control Biológico</b>	14
Atributos de los agentes de biocontrol microbianos	15
Agentes microbianos con potencial de biocontrol de los complejos ambrosiales	16
Actinomicetos como agentes de biocontrol microbianos	17
<i>Streptomyces</i> spp.	19
Actinomicetos como promotores del crecimiento de las plantas	20
Actinomicetos como descomponedores de MO	21
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>23</b>
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>24</b>
Microorganismos, Semillas y Reactivos	24
Caracterización Bioquímica de las Cepas de <i>Streptomyces</i> spp.	24
<b>Fijación de Nitrógeno</b>	24
<b>Producción de Sideróforos</b>	25
<b>Producción de Ácido Indol-3-acético (AIA)</b>	27
<b>Solubilización de Fosfatos</b>	28
Antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Streptomyces</i> spp. contra <i>Fusarium kurosium</i>	29
Promoción del crecimiento <i>in vitro</i> de plántulas de arabidopsis	30
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>31</b>
<b>RESULTADOS.</b>	<b>32</b>
Caracterización bioquímica de las cepas de <i>Streptomyces</i> spp.	32
Actividad biológica <i>in vitro</i> de <i>Streptomyces</i> spp. contra <i>Fusarium kuroshium</i>	33
Promoción del crecimiento <i>in vitro</i> en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>37</b>
<b>RECOMENDACIONES.</b>	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS.</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Hembra de <i>Euwallacea kuroshio</i> , de arriba a abajo y de izquierda a derecha: vista lateral, vista dorsal, vista oblicua posterior de declive, vista frontal--4	
Cuadro 1. Caracteres morfométricos dadas por Smith <i>et al.</i> (2019a) para el diagnóstico de especies de <i>Euwallacea</i> ._____	5
Figura 2._____	7
Figura 3._____	9
Figura 4. Características morfológicas microscópicas utilizadas en la identificación de especies de <i>Fusarium</i> : A-D) formas típicas de macroconidios; E-H) formas de la célula apical del macroconidio; I-L) formas de la célula basal del macroconidio. _	12
Figura 5. Izquierda. Cultivo del hongo simbionte fitopatógeno <i>Fusarium kuroshium</i> . _____	15
Figura 6. Izquierda. Cultivo del hongo simbionte fitopatógeno <i>Fusarium kuroshium</i> . Derecha. Inhibición del crecimiento y producción de conidios de <i>F. kuroshium</i> por una cepa de actinomiceto del género <i>Bacillus</i> . _____	17
Figura 7. Morfología macroscópica de cepas de <i>Streptomyces</i> crecidas en medio de cultivo Czapek. _____	18
Figura 8. Plántulas de arabis <i>Arabidopsis thaliana</i> . A) Plántula testigo. B) Plántula evidenciando la acumulación de biomasa radical inducido por <i>Streptomyces</i> sp. _____	19
Figura 9. Cepa de <i>Streptomyces</i> evidenciando su capacidad para producir sideróforos, uno de los compuestos implicados en la promoción del crecimiento de las plantas. _____	21
Figura 10. Fijación de nitrógeno en agar GNFM por cepas de un actinomiceto no streptomiceto. Izquierda. Reacción negativa; Derecha. Reacción positiva evidenciada por una coloración azul._____	25
Figura 11. Producción de sideróforos en agar CAS por <i>Streptomyces</i> spp. Izquierda. Reacción negativa; Derecha. Reacción positiva evidenciada por una coloración anaranjada alrededor de la colonia._____	26
Figura 12. Producción de AIA por cepas de <i>Streptomyces</i> . Izquierda. Se muestra la curva de calibración a partir de un estándar de AIA en concentraciones de 0 a 0.10 mg/mL. Derecha. Se evidencia la reacción positiva dada por un color rosáceo. _	28
Figura 13. Solubilización de fosfato de calcio por un actinomiceto no streptomiceto usando el medio Pikovskayas. Izquierda. Reacción negativa; Derecha. Reacción positiva evidenciada por un halo transparente alrededor de la colonia. _____	29

Figura 14. Actividad antagónica de <i>Streptomyces</i> spp. contra <i>F. kuroshium</i> por confrontación dual. Izquierda. Testigo positivo (explante de <i>F. kuroshium</i> ). Derecha. <i>Streptomyces</i> sp. vs <i>F. kuroshium</i> .	30
Figura 15. Plántulas de <i>A. thaliana</i> . A) Crecidas en cajas de Petri sin división y B) crecidas en cajas de Petri con división.	31
Cuadro 2. Sustancias producidas por cepas de <i>Streptomyces</i> spp. implicadas en la promoción del crecimiento de las plantas	33
Figura 16. Izquierda. Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium kuroshium</i> por cepas de <i>Streptomyces</i> spp., mediante confrontación dual (directa) y a través de volátiles emitidos por <i>Streptomyces</i> . Derecha. Apariencia de la inhibición del crecimiento micelial de <i>F. kuroshium</i> por confrontación directa.	34
Figura 17. Apariencia de la inhibición del crecimiento micelial de <i>F. kuroshium</i> por confrontación a través de los compuestos volátiles emitidos por las cepas de <i>Streptomyces</i> .	34
Cuadro 3. Efecto <i>in vitro</i> de algunas cepas de microorganismos benéficos algunos parámetros de crecimiento <i>in vitro</i> en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
Figura 18. Apariencia de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> expuestas <i>in vitro</i> a compuestos volátiles (COVs) emitidos por cepas de <i>Streptomyces</i> spp. Izquierda. Plántula de arabis usada como testigo. Derecha. Plántula de arabis evidenciando la mayor acumulación de biomasa de raíces y de pelos radicales inducidos por los compuestos volátiles emitidos por <i>Streptomyces cellostaticus</i> (cepa IA32).	36

## INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos causantes de enfermedades en las plantas son un problema fitosanitario por generar pérdidas cuantitativas y cualitativas en la agricultura y por poner en riesgo la preservación de los recursos fitogenéticos (Creissen *et al.* 2016). En México, recientemente fue identificado el hongo patógeno *Fusarium kuroshium* asociado en simbiosis con el insecto ambrosial formalmente llamado *Euwallacea kuroshio* Gomez and Hulcr (Coleoptera: Curculionidae) conformando el complejo ambrosial *E. kuroshio*-*F. kuroshium* (integrados por un insecto vector y un hongo fitopatógeno) (García-Ávila *et al.* 2016; NAPPO, 2016; Gómez *et al.* 2018; SENASICA, 2018; Smith *et al.* 2019; Carrillo *et al.* 2020). *Fusarium kuroshium* es conocido como uno de los patógenos causantes de la enfermedad conocida como marchitez regresiva por Fusarium o “Fusarium dieback (FD), cuyo insecto vector es el escarabajo barrenador kuroshio (KSHB, por sus siglas en inglés) *E. kuroshio* (Eskalen *et al.* 2018; Boland y Woodward, 2019). Este escarabajo, hace galerías en las plantas hospederas donde inocula y propaga a los hongos *F. kuroshium* y *Graphium kuroshium* (Eskalen *et al.* 2018), donde el micelio de ambos hongos es utilizado por las larvas del escarabajo como alimento (Eskalen, 2022). Para su control, las autoridades fitosanitarias mexicanas a través de SENASICA han implementado acciones oportunas de monitoreo y contención para evitar la dispersión de este complejo ambrosial (*Euwallacea kuroshium*-*Fusarium kuroshium*) y de otros complejos (*Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola*, y *Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae*) que representan un riesgo potencial para las plantaciones agrícolas, urbanas y de especies forestales nativas en el país (SEMARNAT-CONAFOR, 2019), ya que pueden provocar la muerte inmediata del árbol y por lo tanto grandes pérdidas económicas (Boland, 2016; Eskalen *et al.* 2018). En regiones donde se han detectado los complejos ambrosiales (*Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola*, y *Euwallacea* spp.-*Fusarium euwallaceae*), han causado grandes daños en el cultivo de aguacate y otras plantas hospederas (susceptibles), especialmente las pertenecientes a la familia Lauraceae (Carrillo *et al.* 2012; Boland, 2016; van den Berg *et al.* 2019). El hongo patógenos interrumpe el flujo de agua y nutrientes en las plantas hospederas susceptibles, pudiendo matar

ramas y, en casos severos, todo el árbol (Dimson *et al.* 2015; Eskalen *et al.* 2018). Una de las alternativas para el manejo de este fitopatógeno es el uso de agentes microbianos, especialmente cepas de *Streptomyces* ampliamente conocidas como agentes de biocontrol de fitopatógenos, por su alta capacidad antifúngica (Dávila-Medina *et al.* 2013; Pérez-Corral *et al.* 2020, Pérez-Corral *et al.* 2022a) y como promotoras del crecimiento de las plantas (Pérez-Corral *et al.* 2022b) y de bajo o nulo impacto ambiental e inofensivos a la salud humana. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto antifúngico de tres cepas de *Streptomyces* sobre *Fusarium kuroshium* y en la promoción del crecimiento *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

## MARCO TEÓRICO

### **Situación actual de los escarabajos ambrosiales.**

Los escarabajos descortezadores y ambrosía (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) se consideran uno de los grupos de especies invasoras más exitosos y representan una preocupación creciente en todo el mundo (Faccoli *et al.* 2010; Kirkendall y Faccoli, 2020) por sus antecedentes de daños en bosques, viveros, huertas y áreas urbanas. Por ser insectos diminutos son difíciles de detectar y por ende pueden viajar largas distancias sin ser vistos, escondidos en embalajes de madera o plantas vivas (Rafa *et al.* 2015). Dentro de este grupo, las especies del género *Xylosandrus*, *Xyleborus* y *Euwallacea*, son especialmente amenazantes (Kasson *et al.* 2013; Rabaglia, 2018; Urvois *et al.* 2021).

### ***Euwallacea kuroshio***

El escarabajo barrenador kuroshio (KSHB, por sus siglas en inglés) *Euwallacea kuroshio* (Coleoptera: Curculionidae) es nativo del sudeste de Asia (Japón, Indonesia y Taiwán, donde se desarrolla sobre árboles muertos o moribundos (Hulcr *et al.* 2007; Boland y Woodward, 2019), pertenece al grupo de los escarabajos ambrosiales, viven en simbiosis con los hongos *F. kuroshium* y *G. kuroshium*, alimentándose de su micelio (Sahib *et al.* 2008; Eskalen *et al.* 2018). Es vector de la enfermedad conocida como marchitez regresiva por Fusarium o “Fusarium dieback (FD)” en las plantas hospedadas causada por sus hongos fitopatógenos simbiotes que transportan en sus micangios (Freeman *et al.* 2012a; Freeman *et al.* 2013; Eskalen *et al.* 2018). Fue introducido en México y San Diego, California, EUA (García-Avila *et al.* 2016). *Euwallacea kuroshio* junto con *E. fornicatus*, *E. fornicatior*, *E. whitfordiodendrus* son especies genéticamente divergentes que forman parte del complejo de especies de *E. fornicatus* que causan daños a las industrias forestales y ecosistemas en todo el mundo (Freeman *et al.* 2013; Gomez *et al.* 2018). *Euwallacea kuroshio* (Fig. 1) es una plaga importante en té (*Camellia sinensis*) en Sri Lanka, donde fue descrita por primera vez (Danthanarayana, 1968; Mendel *et al.* 2012).

### Impactos de *Euwallacea kuroshio*

Entre los bosques nativos, los peores impactos observados hasta la fecha han sido en el valle del río Tijuana en el sur del condado de San Diego, California, EUA, donde aproximadamente el 30 % de los sauces nativos (*Salix* spp) - aproximadamente 120 000 árboles- han muerto como resultado de una infestación de KSHB (Boland, 2016, 2018). Boland y Deborah (2019) encontraron en su estudio, que los altos niveles de contaminación en el Condado de San Diego, EUA por aguas residuales se correlacionaron con altas tasas de infestación de *E. kuroshio* y mortalidad de sauces, es decir, los sauces que crecen en o cerca del agua contaminada con aguas residuales tenían madera de menor densidad y mayor contenido de humedad, y sufrieron tasas más altas de infestación de *E. kuroshio* y mortalidad inducida por *E. kuroshio* que aquellas que crecían más lejos.



Figura 1. Hembra de *Euwallacea kuroshio*, de arriba a abajo y de izquierda a derecha: vista lateral, vista dorsal, vista oblicua posterior de declive, vista frontal. Tomado de Gomez *et al.* (2018).

### Clasificación taxonómica de *Euwallacea kuroshio*

De acuerdo con Freeman *et al.* (2013) y Gomez *et al.* (2018), la ubicación taxonómica de *Euwallacea kuroshio* es como sigue:

**Reino:** Animalia

**Clase:** Insecta

**Orden:** Coleoptera

**Familia:** Curculionidae

**Género:** *Euwallacea*

**Especie:** *E. kuroshio*

### Descripción morfológica de *Euwallacea kuroshio*

Los especímenes de *E. kuroshio* tienen élitros con una longitud de 1.57 a 1.79 mm y una longitud de pronoto de 1.09 a 1.15 mm, con 8 a 11 dentículos encajados en las protibias (Gomez *et al.* 2018; Smith *et al.* 2019) (Cuadro 1). El ancho del pronoto es de 1.06 a 1.13 mm y el ancho de los élitros es de 0.53 a 0.55 mm (Gomez *et al.* 2018; Smith *et al.* 2019). Los individuos de *E. kuroshio* presentan tamaños corporales más grandes sustentados en las medidas de longitud de los élitros que aquellos individuos de *E. whitfordiodendrus* quienes presentan longitudes corporales intermedias (Gomez *et al.* 2018).

Cuadro 1. Caracteres morfométricos dados por Smith *et al.* (2019a) para el diagnóstico de especies de *Euwallacea*.

Especies	Longitud total (dorsal)	Relación largo/ancho (dorsal)	Longitud de élitros (lateral; diagonal)	Longitud del pronoto (lateral; diagonal)	Ancho de élitros (dorsal)	Ancho del pronoto (dorsal)	Dentículos protibiales
<i>E. fornicator</i>	2.20–2.37	2.15–2.35	1.40–1.46	1.02–1.06	0.48–0.52	1.00–1.06	6–7
<i>E. fornicatus</i>	2.60–2.70	2.25–2.36	1.44–1.72	1.02–1.16	0.48–0.62	1.00–1.14	8–9
<i>E. kuroshio</i>	2.40–2.80	2.17–2.40	1.50–1.82	1.08–1.16	0.52–0.56	1.06–1.16	8–11

<b><i>E. perbrevis</i></b>	2.30-2.5 0	2.46-2.55	1.42-1.68	1.04-1.16	0.48-0.56	1.02-1.14	7-10
----------------------------	---------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------

Información tomada de Smith *et al.* (2019b).

### **Ciclo de vida de *Euwallacea kuroshio***

Los escarabajos ambrosiales, incluido *E. kuroshio* tienen un ciclo de vida completo es decir, constan de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Las hembras adultas de *E. kuroshio* poseen en la base de su aparato bucal un par de micangios, donde “guardan” esporas de su hongo simbionte, para el caso de *E. kuroshio* a *Fusarium kuroshium*, las cuales inoculan en la madera de los árboles al perforar la corteza, donde crean galerías (túneles) e introducen a su hongo simbionte (Fraedrich *et al.* 2008) (Figura 2). El hongo crece y se propaga por los túneles, mientras que la hembra pone huevos en los mismos, para que las larvas neonatas se alimenten del micelio del hongo.

Los machos y hembras completan su ciclo de vida en 41.43 d y 43.49 d, respectivamente. Los huevos eclosionan después de 7.86 d de incubación. El estadio larval dura aproximadamente 19 d. El estado pupal dura 9.78 d ya sea dentro o fuera de las galerías. Los nuevos adultos se aparean mientras están en las galerías. Luego, las hembras salen de las galerías y re-infestan el mismo árbol o vuelan en busca de nuevos árboles hospederos.

### **Síntomas en hospederos**

Los árboles con infestaciones recientes exhiben pocos síntomas externos. Aunque no hay una lesión visible de la colonización, al examinar la madera en el lugar de infestación del escarabajo, se observa una coloración marrón y necrosis del xilema causada por el hongo (CISR, 2012).



Figura 2. Los orificios de entrada son redondos y de unos 0.85 mm de ancho (C1). Se observa el abdomen del escarabajo hembra sobresaliendo del agujero (C2). Los síntomas de los árboles son únicos para cada especie huésped. Alrededor del orificio de entrada, se evidencian manchas oscuras y húmedas que a veces se secan y se vuelven blancas o amarillas (C3), pegajosidad espesa (C4), exudado blanco polvoriento (C5) o excrementos (C6), que se asemejan al aserrín. Imagen tomada de Eskalen *et al.* (2018).

### **Rango de hospederos potenciales de *Euwallacea kuroshio* en México y el mundo**

En Asia se han reportado a más de 100 especies de plantas como hospederas de los escarabajo ambrosiales, incluido *E. kuroshio* (Browne, 1961; Danthanarayana, 1968; Mendel *et al.* 2012). Para *E. kuroshio* se han sugerido los siguientes géneros de plantas como hospederas: *Sambucus* (Adoxaceae), *Liquidambar* (Altingiaceae), *Schinus*, *Searsia* (Anacardiaceae), *Ambrosia*, *Baccharis* (Asteraceae), *Alnus* (Betulaceae), *Ricinus* (Euphorbiaceae), *Quercus* (Fagaceae), *Cassia*, *Persea* (Lauraceae), *Ficus* (Moraceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Juglans*, *Pterocarya*

(Juglandaceae), *Magnolia* (Magnoliaceae), *Fraxinus* (Oleaceae), *Platanus* (Platanaceae), *Populus*, *Salix* (Salicaceae), *Nicotiana* (Solanaceae), *Tamarix* (Tamaricaceae) (Coleman *et al.* 2013; Boland, 2016; Na *et al.* 2018; Smith *et al.* 2019a).

En México, las autoridades fitosanitarias prevén que de no continuar con la vigilancia epidemiológica fitosanitaria y de dispersarse dicha plaga en el país estarían en riesgo más de 327,000 hectáreas de cultivos que son hospedantes reproductivos de *Euwallacea* spp. y 570,826.58 hectáreas de cultivos que son hospedantes potenciales para el desarrollo del hongo simbiote *Fusarium* spp. De igual manera se pone en riesgo a más de 137 millones de hectáreas forestales (SENASICA, 2020). Asimismo, estarían en riesgo 1'112,136 miles de toneladas de aguacate de exportación. El aguacate (*Persea americana* Mill), pertenece a la familia Lauraceae. Los miembros de esta familia son hospederos potenciales de los complejos ambrosiales incluido *Euwallacea* spp.- *Fusarium* spp (Rabaglia *et al.* 2006; Koch y Smith, 2008). Esta familia cuenta con alrededor de 2,500 especies en aproximadamente 50 géneros a nivel mundial. México, cuenta con 120 especies comprendidas en 10 géneros, distribuidas principalmente en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Lorea-Hernández, 2002).

### **Marchitez regresiva por *Fusarium* o “*Fusarium dieback* (FD)**

Esta enfermedad en lauráceas, entre ellas el aguacate, es causada por *Fusarium euwallaceae* y *F. kuroshium*. Este hongo simbiote fitopatógeno está asociado con el escarabajo ambrosial *E. kuroshio* (Eskalen *et al.* 2013), que en conjunto se conoce comúnmente como complejo ambrosial-hongo. En esta asociación, el escarabajo hembra que almacena el hongo simbiote en sus micangios lo dispersa a través de las galerías hechas en el xilema del árbol, este hongo crece en los tejidos infectados y las larvas de los escarabajos se alimentan del micelio producido. Las hifas del hongo patógeno es capaz de moverse sistémicamente en el árbol causando una restricción/bloqueo en el flujo de agua y nutrientes, estos primeros ataques son suficientes para el desarrollo de la enfermedad, induciendo que las hojas se marchiten (Batra, 1967; Harrington *et al.* 2008; Harrington *et al.* 2011).

Después, el follaje más cercano a la corona se torna de color rojizo o violáceo (Fraedrich *et al.* 2008). En el laurel rojo (*Persea borbonia* L. Spreng), se ha observado que después del ataque, las hojas de la corona luego de marchitarse se tornan de color marrón (Fraedrich *et al.* 2008). Las hojas marchitas pueden permanecer adheridas al árbol hasta por un año. Eventualmente, la muerte regresiva de ramas resulta de una infección avanzada por hongos asociados (*Fusarium* spp.) a barrenadores invasivos (Figura 3). La mayoría de los escarabajos ambrosiales atacan a plantas moribundas o muertas; sin embargo, algunas especies exóticas de los géneros *Xylosandrus*, *Xyleborus* y *Euwallacea*, atacan a árboles y arbustos aparentemente sanos (Hanula *et al.* 2008).

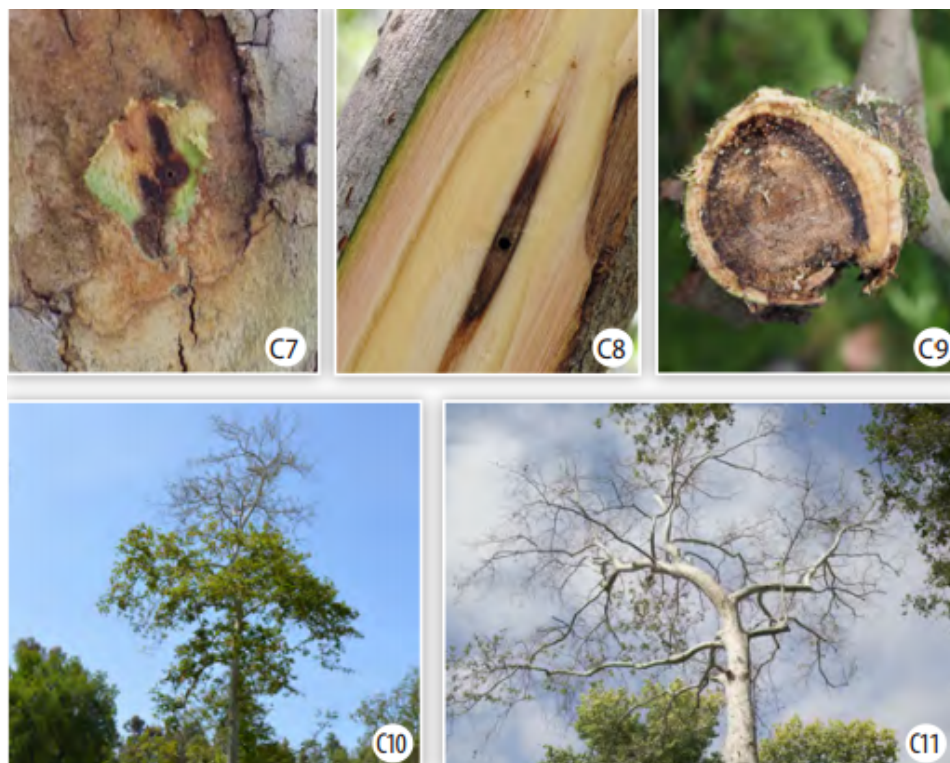


Figura 3. Los síntomas de infección por patógenos de muerte regresiva por *Fusarium* o Fusarium Dieback incluyen decoloración de marrón a negro en la madera debajo de la corteza. Raspones en la corteza alrededor del orificio de entrada o salida evidenciado por manchas oscuras que rodean la galería (c7, c8). Las secciones transversales de las ramas cortadas muestran la extensión de la infección (c9). La muerte regresiva de ramas es el resultado de una infección

avanzada por hongos asociados a barrenadores invasivos. Imagen tomada de Eskalen *et al.* (2018).

En troncos y ramas de las plantas infestadas es común observar pequeños tapones de virutas compactadas, que sobresalen de los orificios (Figuras 2 y 3), aunque éstos no siempre están presentes, ya que se desintegran fácilmente (Mann *et al.* 2011). Al eliminar la corteza del árbol, se pueden observar mejor las perforaciones en la madera por el insecto, acompañado de manchas oscuras producidas por el hongo simbionte patógeno a lo largo de los tejidos del árbol (floema y xilema), a través de los cuales se suministra el agua y los nutrientes requeridos por la planta para su funcionamiento (Mann *et al.* 2011). En consecuencia, las hojas y ramas jóvenes se marchitan en algunas secciones del árbol o en el árbol completo si la infestación del tronco es alta. Las hojas pueden caerse, o secarse y permanecer unidas a las ramas, estos síntomas avanzan gradualmente, originando la muerte regresiva de hojas, tallos y troncos, hasta que finalmente el árbol colapsa (Fraedrich *et al.* 2008).

### ***Fusarium kuroshium***

*Fusarium* es uno de los géneros fúngicos con mayor número de especies. Hasta la fecha se han descrito más de 1200 especies. Muchos de ellos son importantes patógenos de plantas. Este género consiste en un complejo de especies anamórficas con una alta variación morfológica y fisiológica, con la capacidad de crecer saprófitamente o colonizando la planta. Algunas especies de *Fusarium* se han asociado con escarabajos ambrosiales, especialmente en el género *Euwallacea* (Coleoptera: Scolytinae). Algunos de estos hongos simbiontes como *F. euwallaceae* y *F. kuroshium* son patógenos de plantas y causan daños significativos en ecosistemas naturales y cultivados (Cruz *et al.* 2021). *Fusarium euwallaceae* y *F. kuroshium* son responsables de la muerte regresiva por Fusarium o Fusarium dieback (Lynch *et al.* 2016; Na *et al.* 2018). Al invadir los tejidos vasculares de las plantas, bloquean el transporte de nutrientes e inducen el

marchitamiento y la muerte regresiva de las ramas, lo que puede conducir a la muerte de los árboles (Eskalen *et al.* 2013).

La mayoría de las especies de *Fusarium* ambrosiales producen macroconidios inusuales (Figura 4) que sirven como fuente de alimento putativo para sus insectos mutualistas (Kasson *et al.* 2013). El hongo ambrosial *F. kuroshium* depende de sus escarabajos vectores (*E. kuroshio*) para su dispersión (Ranger *et al.* 2021), ya que las esporas del hongo son transportadas por los escarabajos en estructuras especializadas en forma de saco llamadas micangios, lo que facilita la propagación del hongo entre los árboles hospederos cercanos a la infestación del insecto (Batra, 1963).

#### **Caracteres morfológicos de *Fusarium* spp.**

Las especies de *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas asexuales llamadas macroconidios, microconidios y clamidosporas (Figura 4). El macroconidio es la spora principal en la caracterización, su forma y tamaño varían según la especie y pueden originarse a partir de estructuras especializadas (esporodoquios, monofiálides y polifiálides) o directamente del micelio aéreo (Watanabe, 2010) La presencia de una célula basal en forma de pie es una característica distintiva de *Fusarium*. El microconidio es un carácter taxonómico primario, del cual se considera la forma, modo de formación, si están solos, en falsas cabezas, cabezas o cadenas. Pueden formarse en el micelio aéreo a partir de mono o polifiálides, pero no en esporodoquios (Figura 4). Otros caracteres taxonómicos primarios son clamidosporas, conidióforos y mesoconidios.

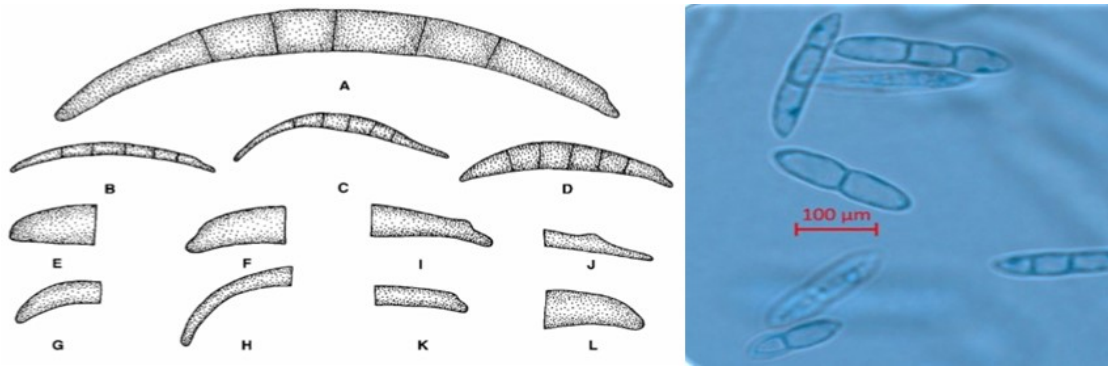


Figura 4. Características morfológicas microscópicas utilizadas en la identificación de especies de *Fusarium*: A-D) formas típicas de macroconidios; E-H) formas de la célula apical del macroconidio; I-L) formas de la célula basal del macroconidio.

### **Estrategias de control de *Fusarium kuroshium***

Las principales estrategias destinadas a mitigar el impacto de *F. kuroshium* incluyen la aplicación de agroquímicos de amplio espectro y la incineración de árboles enfermos, acompañados de monitoreo continuo.

### **Control químico**

El método más comúnmente utilizado para el control de enfermedades en plantas, es el control químico mediante el uso de fungicidas que matan o inhiben la germinación, crecimiento o multiplicación de patógenos y en consecuencia protegen a las plantas de infecciones subsecuentes (Oliver y Hewitt 2014; Marian y Shimizu, 2019). La aplicación de agroquímicos de amplio espectro es actualmente la principal práctica de manejo para la mitigación del impacto causado por los complejos ambrosiales (escarabajo/hongo). Se ha sugerido la aplicación repetida de insecticidas de contacto para evitar infestaciones y sistémicos para matar a los escarabajos que ya están dentro de los árboles (Paine *et al.* 2011; Castrillo *et al.* 2016; Jones y Paint, 2018). Mientras que para reducir la propagación del hongo simbionte se sugiere la aplicación del fungicida sistémico propiconazol (Mayfield III *et al.* 2008; Freeman *et al.* 2012b). También se ha sugerido tratar el suelo con fungicidas/insecticidas, después de que se haya presentado la

enfermedad/infestación para eliminar cualquier fuente potencial (López-Buenfil *et al.* 2017).

### **Control legal o normativo**

El control legal o regulatorio consiste en evitar o excluir patógenos de áreas donde todavía no existen, operando a niveles nacionales e internacionales. Esto implica la prohibición o restricción para la introducción de plantas o partes de ellas, las cuales pueden haber estado en contacto con fitopatógenos o traigan consigo los insectos exóticos asociados (Maloy, 2005; Pimentel *et al.* 2000, 2005). Las autoridades fitosanitarias de México han implementado algunas medidas para la contención y el manejo de los complejos ambrosiales, destacando el “Plan de Acción para la Vigilancia y Aplicación de medidas de control contra complejos ambrosiales reglamentados en México: *Xyleborus glabratus* - *Raffaelea lauricola* y *Euwallacea* sp. - *Fusarium euwallaceae*”, publicado por la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en febrero de 2015. En el cual, se presentan aspectos generales, técnicos y de manejo (delimitación, contención y erradicación) de las plagas. Mientras tanto, instan evitar la movilización de material vegetal propagativo, leña, material de embalaje del laurel rojo u otras plantas hospederas potenciales y realizar monitoreos e inspecciones constantes en las áreas agrícolas y zonas forestales potenciales.

### **Control cultural**

Este método de control consiste en evitar y reducir las enfermedades mediante acciones indirectas sobre los fitopatógenos (Brown *et al.* 1997). Para prevenir tanto la propagación del hongo *F. kuroshium* como la diseminación de los escarabajos ambrosiales se sugiere eliminar el árbol enfermo en la misma área en donde son detectados. Lo anterior, es debido a que se ha evidenciado que en las virutas o astillas de madera se pueden encontrar estados inmaduros del insecto. Por lo tanto, también se recomienda eliminar árboles en decadencia o madera muerta, debido a que algunas especies de escarabajos ambrosiales se crían en éstos, además de eliminar las arvenses asociadas a dichos árboles (López-Buenfil *et al.* 2017). Para su implementación se sugieren inspecciones constantes en las áreas agrícolas y zonas forestales potenciales, para detectar signos y/o síntomas (amarillamientos,

decoloraciones, marchitamientos, orificios de entrada, entre otros), típicos de la enfermedad, así como la muerte regresiva por Fusariosis o árboles con ataques o presencia de escarabajos ambrosiales (García-Ávila *et al.* 2016). Para el caso de árboles cultivados, se recomienda mantenerlos vigorosos, dado que los escarabajos ambrosiales generalmente atacan a árboles estresados.

### **Control físico**

Los árboles cercanos al punto de detección ubicados dentro de la zona de seguridad y que presenten algún tipo de estrés, daño mecánico en el tronco o podas recientes, son candidatos para ser enrollados por el plástico (película elástica), éste se enrolla alrededor del tronco del árbol hasta una altura de 1.5 m y una vez que se coloca el plástico se procede a cubrirlo con pegamento (Tree Tanglefoot Insect Barrier; López-Buenfil *et al.* 2017).

### **Control Biológico**

Las restricciones agroquímicas actuales para la exportación de cultivos como el aguacate, por los inconvenientes que presenta el uso intensivo de compuestos químicos por el enorme deterioro medioambiental y la creciente demanda de estrategias amigables con el medio ambiente exigen explorar el control biológico basado en la aplicación de agentes microbianos (entomopatógenos y antagonistas) para el manejo de los escarabajos ambrosiales y sus simbiontes fúngicos fitopatógenos (Eskalen *et al.* 2014; Dunlap *et al.* 2017; Reverchon *et al.* 2019; Castrejón-Antonio *et al.* 2020; Reverchon *et al.* 2021). El control biológico es una estrategia de bajo o nulo impacto ambiental, es decir, es amigable con el medio ambiente e inocuo al ser humano y animales. Por lo tanto, los agentes de biocontrol microbianos, especialmente hongos (*Trichoderma* spp.), bacterias (*Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp.) podrían ser una alternativa prometedora para mitigar el impacto de los complejos ambrosiales (escarabajo/hongo simbionte) (Reverchon *et al.* 2021).

### Atributos de los agentes de biocontrol microbianos

Los agentes de biocontrol microbianos son ecológicamente deseables en los programas de manejo integrado de enfermedades (MIE), debido a su inocuidad al medio ambiente. Se ha documentado ampliamente la capacidad de algunas cepas de microorganismos entomopatógenos para suprimir poblaciones de plagas. Así como, de microorganismos antagonistas que suprimen el desarrollo de fitopatógenos como *Fusarium* spp. (Fig. 5) mediante diversos mecanismos como competencia por espacio, nutrientes, oxígeno y/o produciendo sustancias antifitopatogénicas (Adnan *et al.* 2019; Pérez-Corral *et al.* 2020). En algunas cepas de microorganismos se ha demostrado su potencial de biocontrol dual, es decir, tienen efectos entomopatógenicos y antifitopatogénicos, además de promover el crecimiento de las plantas y mejorar la productividad de los cultivos hortofrutícolas (Pérez-Flores *et al.* 2017; Chukwuneme *et al.* 2020; Poveda, 2021).

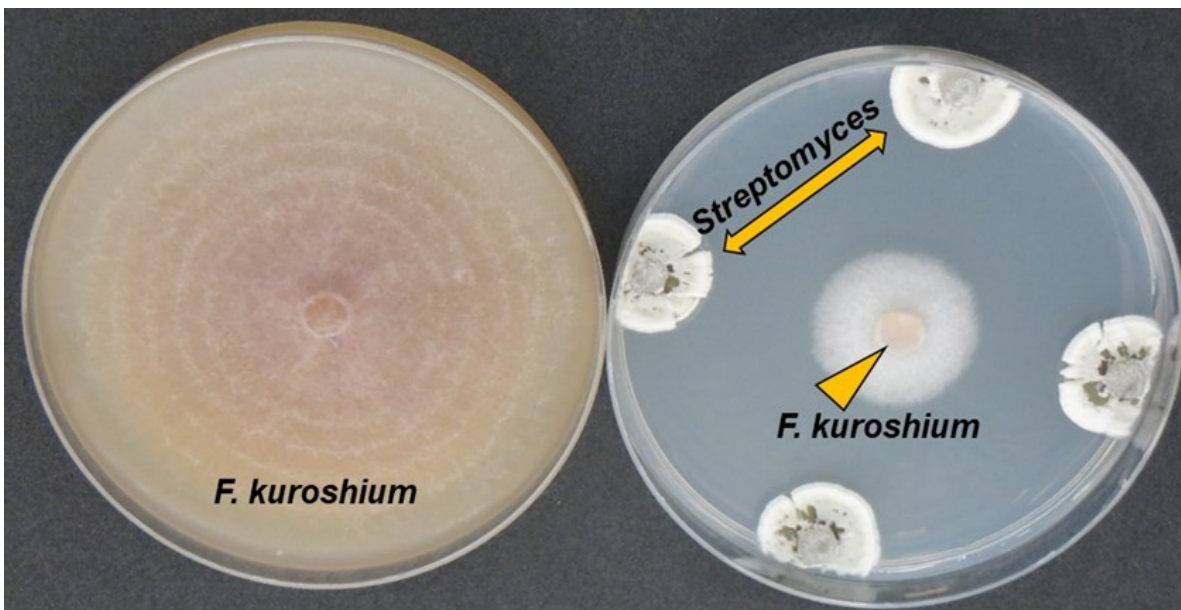


Figura 5. Izquierda. Cultivo del hongo simbiote fitopatógeno *Fusarium kuroshium*. Derecha. Inhibición del crecimiento y producción de conidios de *F. kuroshium* por una cepa de actinomiceto del género *Streptomyces*.

La eficacia en el biocontrol de los agentes microbianos contra fitopatógenos radica en sus múltiples atributos como: Versatilidad, adaptabilidad a diferentes condiciones agroclimáticas y edáficas, fácil manejo y reproducción, rápido crecimiento permitiéndole colonizar rápidamente la superficie, eficiencia en la utilización de nutrientes, capacidad para modificar la rizósfera y persistir en ella de manera efectiva, mejorar la calidad de suelos agrícolas, además de ser capaces de sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales desfavorables (Wisniewski y Wilson, 1992). Además de otras características específicas del agente microbiano, tales como su estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, no exigente en requerimientos nutricionales, efectividad para un amplio rango de microorganismos patógenos, un largo período de anaquel, de fácil aplicación, resistente a fungicidas y compatible con productos químicos y equipos de aplicación, entre otros (Wisniewski *et al.* 2007).

### **Agentes microbianos con potencial de biocontrol de los complejos ambrosiales**

Los agentes microbianos (bacterias y hongos) son capaces de ejercer un efecto de biocontrol sobre diferentes patógenos de interés agrícola y forestal (Wisniewski y Wilson, 1992; De Costa y Erabadupitiya, 2005). Por lo tanto, tienen un potencial prometedor para el biocontrol de los complejos ambrosiales (escarabajo/hongo simbiote fitopatógeno) en áreas agrícolas y forestales (Reverchon *et al.* 2021), mediante sus diferentes mecanismos de acción como antibiosis, producción de enzimas líticas, parasitismo, competencia por los nutrientes y espacio, inducción de resistencia, entre otras. Los principales agentes antagonistas prometedores para la prevención y supresión de *Fusarium kuroshium*, patógeno causante de la marchitez regresiva en lauráceas y árboles forestales son cepas de hongos, bacterias y actinomicetos, especialmente de los géneros *Trichoderma*, *Bacillus* y *Streptomyces*, respectivamente (Figura 6). Aunque también se han documentado cepas de hongos comúnmente conocidos como entomopatógenos con acción antifitopatógena, especialmente de los géneros *Verticillium*, *Metarhizium* y *Beauveria*.

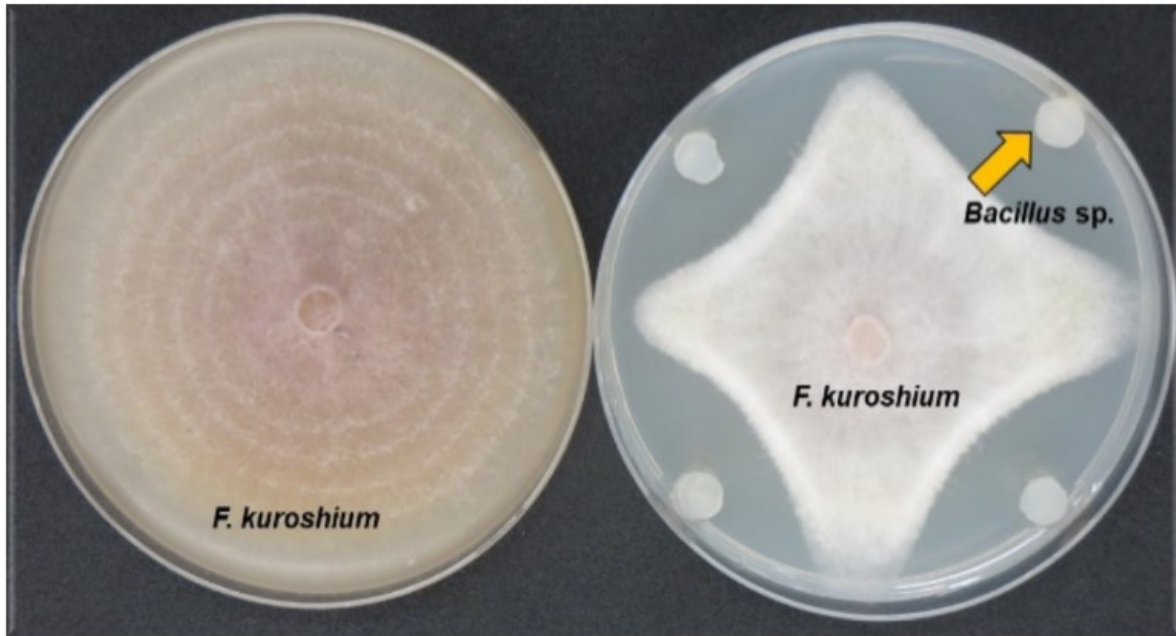


Figura 6. Izquierda. Cultivo del hongo simbiote fitopatógono *Fusarium kuroshium*. Derecha. Inhibición del crecimiento y producción de conidios de *F. kuroshium* por una cepa de bacteria del género *Bacillus*.

### **Actinomicetos como agentes de biocontrol microbianos**

Las actinobacterias (actinomicetos) pertenecen al filo actinobacteria, subclase actinobacteridae, orden de los actinomicetales, en el que se agrupan 14 subórdenes, 49 familias y más de 140 géneros. Son bacterias filamentosas Gram positivas con altos niveles de guanina y citosina en su ADN (Bhatti *et al.* 2017). Las actinobacterias tienen dos formas celulares, el crecimiento filamentosos que consta de micelio de substrato y aéreo, en esta forma es donde se da la reproducción y síntesis de compuestos. La segunda forma celular son las esporas (que son las estructuras de resistencia), éstas germinan cuando las condiciones ambientales son favorables y pasan a la forma vegetativa (Mayfiel *et al.* 1972). El micelio es ramificado, no fragmentado, generalmente con hifas vegetativas de entre 0.2 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, el micelio forma cadenas de esporas cuando madura y pueden ser lisas, espinosas, vellosas, rugosas o granuladas no móviles. Las colonias son secas y serosas, capaces de producir pigmentos, algunos de éstos difusibles en el medio (Figura 7; Goodfellow *et al.* 2012).



Figura 7. Morfología macroscópica de cepas de *Streptomyces* crecidas en medio de cultivo Czapek.

Los actinomicetos son excelentes agentes de biocontrol microbianos de fitopatógenos por su potencial en la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Se ha documentado ampliamente su habilidad para suprimir el crecimiento de una gran variedad de hongos fitopatógenos (Chaurasia *et al.* 2018). Suprimen el crecimiento de fitopatógenos de manera directa mediante antibiosis a través de la biosíntesis de compuestos antimicrobianos volátiles y no volátiles, la degradación de las paredes celulares por enzimas líticas, competencia por espacio y nutrientes e hiperparasitismo (Karimi *et al.* 2012) e indirectamente mediante la inducción/activación de los mecanismos de defensa de la planta al producir compuestos elicitors como fitohormonas y señalizadores móviles como el ácido salicílico (Viaene *et al.* 2016). Muchas de las cepas de actinomicetos usados como agentes de biocontrol microbianos para suprimir fitopatógenos, adicionalmente, inducen el sistema de defensa de la planta hospedera contra los patógenos y promueven el crecimiento vegetal favoreciendo la asimilación de nutrientes (Figura 8).



Figura 8. Plántulas de *Arabidopsis thaliana*. A) Plántula testigo. B) Plántula evidenciando la acumulación de biomasa radical inducido por *Streptomyces* sp.

### ***Streptomyces* spp.**

Se han reportado varios géneros de actinomicetos con potencial de biocontrol. Sin embargo, el más representativo y más ampliamente distribuido es *Streptomyces*. Su acción antifúngica o antibacteriana es dada por la producción de metabolitos secundarios (antibióticos, antifúngicos, enzimas extracelulares biodegradativas como quitinasas, peroxidasas, glucanasas involucradas en el micoparasitismo, inhibidores enzimáticos, terpenoides, entre otros), con actividad antimicrobiana (Baltz, 2007; Demain y Sanchez, 2009; Franco-Correa *et al.* 2010; Kekuda *et al.* 2010; Harir *et al.* 2018). También producen compuestos volátiles (COVs) tales como valinomicina, reveromicinas A y B, trans-2-hexenal, disulfuro de dimetilo, entre otros, con acción antifitopatogénica (Pérez-Corral *et al.* 2020). Se ha sugerido también

que son capaces de activar los sistemas de defensa de las plantas principalmente las resistencias sistémicas, y esto les permite a las plantas aminorar los efectos de fitopatógenos y plagas insectiles (Van Wees *et al.* 1997; Cartieaux *et al.* 2008; Walker *et al.* 2011).

### **Actinomicetos como promotores del crecimiento de las plantas**

Se han reportado diversos géneros bacterianos capaces de promover el crecimiento vegetal, entre los que destacan *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum* y *Streptomyces* (actinomicetos/actinobacterias). Los actinomicetos, especialmente de los géneros *Streptomyces*, son capaces de promover el crecimiento radical y aéreo de las plantas debido a la producción de sustancias promotoras como el AIA, sideróforos trihidroxamatos como ferrioxamina o albomicina (sideromicina quelante de hierro), catecol o dihidroxamato, estos quelan el hierro disponible en el ambiente y lo hacen más asequible para las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Ortiz-Castro *et al.* 2009; Pérez-Montaña *et al.* 2014). Adicionalmente, algunas cepas de *Streptomyces* son capaces de solubilizar fosfatos (fósforo inorgánico) y fijar nitrógeno atmosférico. La solubilización del fósforo ocurre por la formación de ácidos, que actúan como agentes quelantes para el calcio, aumentando la disponibilidad del fósforo para la planta, lo que presumiblemente favorecería el crecimiento de éstas (Gopalakrishnan *et al.* 2014). Además, algunas cepas de *Streptomyces* producen compuestos que promueven el crecimiento de las plantas, que incluyen ácido indol-3-acético (auxina), griseobactina (sideróforo; Figura 9) y ácido giberélico (Gouvêa *et al.* 1997; Leveau y Lindow, 2005; Glick *et al.* 2007). En conclusión, las cepas de *Streptomyces* mejoran la calidad de frutos y potencializan el rendimiento en los cultivos mediante la producción de fitohormonas y al favorecer la disponibilidad de fosfatos y otros minerales necesarios para el metabolismo de las plantas.

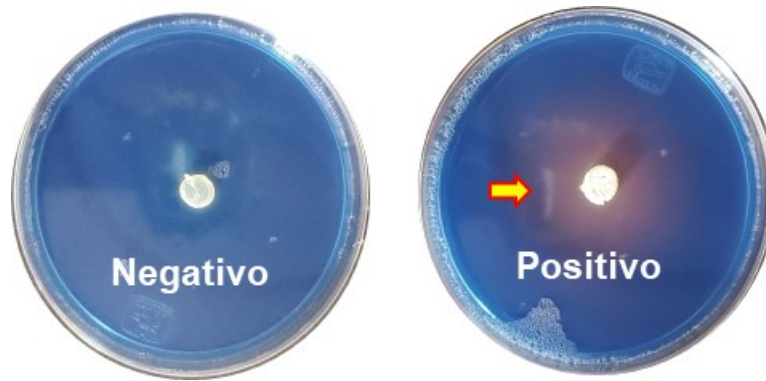


Figura 9. Cepa de *Streptomyces* evidenciando su capacidad para producir sideróforos, uno de los compuestos implicados en la promoción del crecimiento de las plantas

### **Actinomicetos como descomponedores de MO**

Muchas de las cepas de actinomicetos usados como agentes de biocontrol microbianos para suprimir fitopatógenos, adicionalmente, aceleran la descomposición (degradación) de los residuos de cosecha y otros compuestos, que en consecuencia mejoran la calidad de los suelos agrícolas. Descomponen la materia orgánica (MO) mediante la producción de diversas enzimas hidrolíticas y ligninolíticas (Usha *et al.* 2011; Bhatti *et al.* 2017). Por lo tanto, estos agentes microbianos son una buena alternativa para usarse como aceleradores de la descomposición/degradación de los residuos de cosechas.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La reciente detección de los complejos ambrosiales (*Euwallacea kuroshio*/*Fusarium kuroshium*) en México pone en riesgo los recursos fitogenéticos, ya que cuenta con una gran diversidad de plantas, incluyendo cultivos como el aguacate, árboles forestales y especies nativas, que pudieran ser potenciales hospederas de éstos y otros complejos ambrosiales. En países como EUA donde se han registrado la presencia de estos complejos ambrosiales se han documentado daños considerables a árboles de cultivo como el aguacate, árboles de áreas urbanas y plantas nativas. El hongo fitopatógeno *F. kuroshium* simbiote de *E. kuroshio*, causa la enfermedad conocida como muerte regresiva por Fusarium o Fusarium dieback en lauráceas, entre ellas el aguacate (Eskalen *et al.* 2013). Las principales estrategias destinadas a mitigar este y otros complejos ambrosiales es la aplicación de agroquímicos (insecticidas/fungicidas) de amplio espectro con resultados satisfactorios y la incineración de árboles enfermos, acompañados de un monitoreo continuo. Sin embargo, dados los inconvenientes que presenta el uso intensivo de sustancias químicas por el enorme deterioro medioambiental y la creciente demanda de estrategias amigables con el medio ambiente se propone el control biológico basado en la aplicación de agentes de biocontrol microbianos (entomopatógenos y antagonistas) como una alternativa prometedora para el manejo de los escarabajos ambrosiales y sus simbioses fúngicas fitopatógenos, por ser una estrategia de bajo o nulo impacto ambiental, e inocuo al ser humano y animales. Por lo tanto, cepas de *Streptomyces* spp podrían ser una alternativa prometedora para mitigar el impacto de los complejos ambrosiales (escarabajo/hongo simbiote). El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de cepas de *Streptomyces* contra *Fusarium kuroshium* y su efecto *in vitro* en la promoción del crecimiento en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

## HIPÓTESIS

Las cepas de *Streptomyces* spp inhiben eficazmente el crecimiento *in vitro* del hongo fitopatógeno *Fusarium kuroshium* simbiote de *Euwallacea kuroshio* y promueven el crecimiento en plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico *in vitro* de cepas de *Streptomyces* spp. contra el hongo patógeno *Fusarium kuroshium* y su capacidad para promover el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad de tres cepas de *Streptomyces* spp. en la inhibición *in vitro* de *Fusarium kuroshium*.
2. Verificar y cuantificar la producción de sideróforos y ácido 3-indol acético, solubilizar fosfatos y fijar nitrógeno atmosférico por las tres cepas de *Streptomyces*.
3. Evaluar la capacidad de las cepas de *Streptomyces* para promover el crecimiento *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Microorganismos, Semillas y Reactivos**

Todos los reactivos (grado analítico) utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, MO, EUA). Las cepas de *Streptomyces lactacystinicus* (CIAD-IA07), *S. cellostaticus* (CIAD-IA32) y *S. mauvecolor* (CIAD-IA104), fueron proporcionadas por el cepario del CIAD, Unidad Cuauhtémoc. La cepa HFEW-16-IV-019 del fitopatógeno *Fusarium kuroshium* utilizada para este estudio fue proporcionada por La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), a través del Servicio Nacional de Sanidad Pública, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) y la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) del gobierno de México, por ser un patógeno cuarentenario, los experimentos de confrontaciones *in vitro* se realizaron en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), bajo el nivel de bioseguridad 2 (BSL-2). El hongo fue aislado de micángios del escarabajo *E. kuroshio* en Tijuana, México e identificado como *F. kuroshium* (García-Avila *et al.* 2016). Las cepas de *Streptomyces* fueron crecidas en Czapek agar. *Fusarium kuroshium* fue sub-cultivado en el medio de cultivo Papa Dextroza Agar (PDA) a  $28 \pm 1$  °C por 7 d, previo a su uso. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* (genotipo salvaje Col-0, usadas como plantas modelo) fueron proporcionadas por Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-Irapuato, Guanajuato, México) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

### **Caracterización Bioquímica de las Cepas de *Streptomyces* spp.**

#### **Fijación de Nitrógeno**

La capacidad de las tres cepas de *Streptomyces* spp. para fijar nitrógeno se evaluó de forma cualitativa utilizando el medio mineral de glucosa libre de nitrógeno (GNFM, por sus siglas en inglés) con azul de bromotimol (BTB, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la metodología propuesta por Ahmad *et al.* (2013). Este medio se preparó usando 10 g de glucosa, 1 g de  $K_2HPO_4$ , 0.2 g de  $MgSO_4$ , 0.2 g de NaCl, 1 g de  $CaCO_3$ , 0.005 g de  $NaMoO_4$ , 0.1 g de  $FeSO_4$ , 20 g de agar y 1 L agua destilada. Al final, el medio se ajustó el pH a 7. En seguida, se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 PSI por 20 min. Este medio se vació en cajas de Petri (90

× 15 mm), las cuales se inocularon en el centro con explantes de cada una de las cepas de *Streptomyces* y se incubaron a  $29 \pm 1$  °C por 7 d. Aquellas cepas que desarrollaron un color azul alrededor de la colonia, se consideraron positivas (Figura 10).

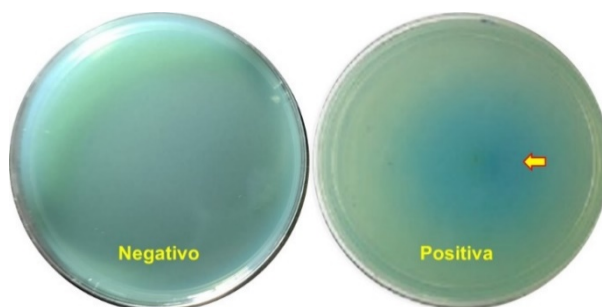


Figura 10. Fijación de nitrógeno en agar GNFM por cepas de un actinomiceto no streptomyceto. Izquierda. Reacción negativa; Derecha. Reacción positiva evidenciada por una coloración azul.

### **Producción de Sideróforos**

La producción de sideróforos por las cepas de *Streptomyces* spp. se evaluó *in vitro* en agar cromoazurol (Alexander y Zuberer, 1991). Un explante de 7 mm de diámetro de *Streptomyces* con 7 d de crecimiento en Czapek Dox se inoculó en el centro de la caja de Petri (90 × 15 mm) que contenía el agar cromoazurol. Las cajas se incubaron a  $29 \pm 1$  °C por 7 d. Se consideraron cepas positivas a la producción de sideróforos a aquellas que formaron halos con una coloración anaranjada alrededor de la colonia (Figura 11).

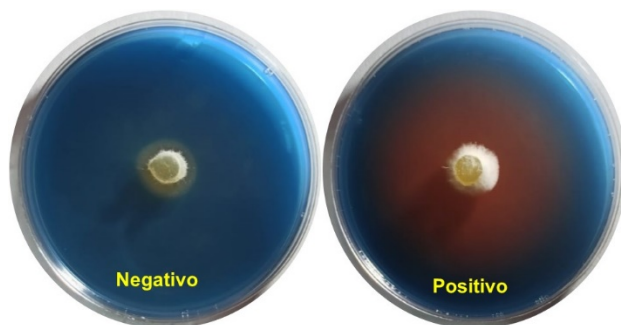


Figura 11. Producción de sideróforos en agar CAS por *Streptomyces* spp. Izquierda. Reacción negativa; Derecha. Reacción positiva evidenciada por una coloración anaranjada alrededor de la colonia.

En aquellas cepas en las que se evidenció la producción de sideróforos, se procedió a realizar la cuantificación de acuerdo con las metodologías de Schwyn y Neilands (1987) y Lee *et al.* (2012). Para ello, las cepas de *Streptomyces* se crecieron en tubos cónicos de 15 mL que contenían 4 mL de medio ISP4 líquido. Este medio consistió de 4 g/L de almidón soluble, 1 g/L de extracto de levadura, 2 g/L KNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L CaCO<sub>3</sub>, 0.01 g/L y 25 g/L de agar y un litro de agua destilada. Los tubos se incubaron a 28 ± 1 °C con agitación constante (180 rpm) por 7 d. Los tubos cónicos que contenían el crecimiento de los *Streptomyces* se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante y se filtró usando acrodiscos estériles de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0.20 µm (Corning®). Se recuperaron 500 µL del sobrenadante y se mezclaron con una proporción igual (500 µL) del reactivo CAS, el cual se preparó a partir de varias soluciones [(Solución I: HDTMA (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 10 mM), (Solución II: FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mM diluidos en 10 mM HCl), (Solución III: cromoazurol S 2 mM), (Solución IV: 4.307g de PIPES (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid), piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid), 1,4-piperazinediethanesulfonic acid) disueltos en 10 agua destilada estéril, a los que se adicionó lentamente y en agitación constante 6.25 mL de HCl 12 M, antes de ajustar su pH a 5.6 con NaOH concentrado)]. En un matraz aforado de 100 ml se adicionaron 6 mL de la solución I y 10 mL de agua destilada estéril, luego 1.5 mL de la solución II, 7.5 mL de la

solución III y el total de la solución IV, aforando con agua destilada estéril a 100 mL. Finalmente, se adicionó ácido 5-sulfosalicílico a una concentración final de 4 mM. La reacción se incubó por 60 min a temperatura ambiente ( $23 \pm 1$  °C). En seguida, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Evolution™ 300 UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, EUA) a 630 nm. El porcentaje de unidades de sideróforos (% US) producidas por las cepas de *Streptomyces* spp se determinó empleando la siguiente ecuación.

$$\%US = \frac{(A_{630M} - A_{630R})}{A_{630R}} \times 100$$

Donde:

%US: es el % de unidades de sideróforos.

A<sub>630M</sub>: es absorbancia de la muestra a 630 nm.

A<sub>630R</sub>: es la absorbancia de la referencia a 630 nm.

### **Producción de Ácido Indol-3-acético (AIA)**

Para inducir la producción de AIA por las cepas de *Streptomyces* spp., se inoculó 1 mL de un precultivo de *Streptomyces* spp con 3 d de crecimiento en 4 mL de caldo ISP2 adicionado con L-triptófano (150 mg/L) y se incubó a  $28 \pm 1$  °C en agitación constante (180 rpm) por 7 d. Este cultivo se centrifugó a  $10,000 \times g$  por 5 min, luego se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido, se mezcló con 2 mL del reactivo de Salkowski (150 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, 250 mL de agua destilada estéril y 7.5 mL de 0.5 M de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) y se incubó por 20 min en obscuridad a temperatura ambiente ( $23 \pm 1$  °C). Se consideraron positivas a la producción de AIA fueron aquellas que se tornaron de color rosa (Fig. 12). En las cepas positivas se cuantificó el AIA producido por cada cepa. Para este propósito, se realizó una curva de calibración a partir de un estándar de AIA en concentraciones de 0 a 0.10 mg/mL (Fig. 12). La absorbancia se midió a 530 nm en un espectrofotómetro (Evolution™ 300 UV-Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, EUA; de Oliveira-Longatti *et al.*, 2014).

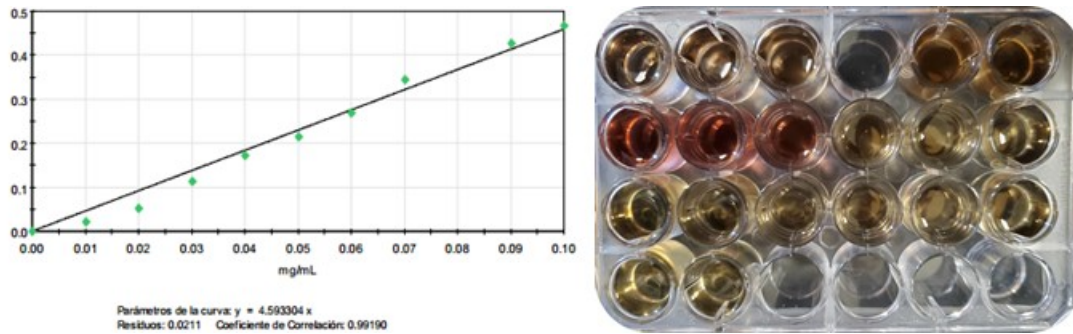


Figura 12. Producción de AIA por cepas de *Streptomyces*. Izquierda. Se muestra la curva de calibración a partir de un estándar de AIA en concentraciones de 0 a 0.10 mg/mL. Derecha. Se evidencia la reacción positiva dada por un color rosáceo

### Solubilización de Fosfatos

La capacidad de *Streptomyces* spp para solubilizar el fosfato de calcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , se evaluó en medio Pikovskayas (PKV), el cual estuvo consistió de 0.5 g de extracto de levadura, 10 g de dextrosa, 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , g de KCl 0.2, 0.1 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0.0001 g de  $\text{MnSO}_4$ , 0.0001 g de  $\text{FeSO}_4$  y 15 g de agar disueltos en un 1 litro de agua destilada. El pH del medio se ajustó a 7.2, previo a su esterilización. Una vez solidificado el medio PKV, se inoculó en el centro de la caja de Petri, un explante de 7 mm de diámetro de cada cepa de *Streptomyces* spp con 7 d de edad crecidas en medio Czapek Dox. En seguida, se incubaron a  $29 \pm 1$  °C por 7 d. Se consideraron positivas para solubilización de fosfatos a las cepas que desarrollaron un halo transparente alrededor de la colonia (Figura 13; Soltani *et al.* 2010). Dado que nuestras cepas de *Streptomyces* fueron incapaces de solubilizar fosfatos, no se procedió con la cuantificación de la misma.

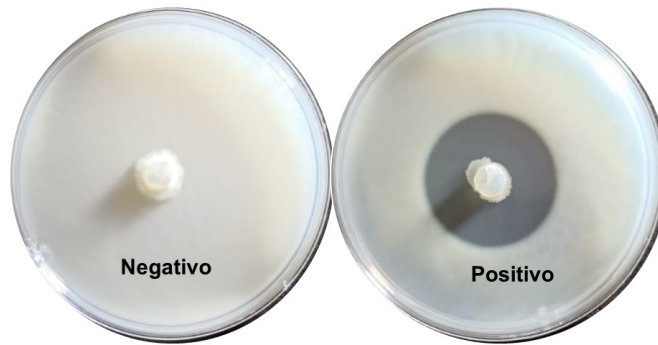


Figura 13. Solubilización de fosfato de calcio por un actinomiceto no streptomiceto usando el medio Pikovskayas. Izquierda. Reacción negativa; Derecha. Reacción positiva evidenciada por un halo transparente alrededor de la colonia.

#### **Antagonismo in vitro de *Streptomyces* spp. contra *Fusarium kuroshium***

La actividad antifúngica *in vitro* de *Streptomyces* spp. contra *F. kuroshium* se evaluó mediante confrontaciones (cultivos) duales y por compuestos volátiles (COVs) emitidos por las cepas de *Streptomyces*. Las confrontaciones duales consistieron en colocar cuatro explantes de 6 mm de diámetro de *Streptomyces* sp, previamente crecidos en medio sólido ISP4 en los puntos cardinales de las cajas de Petri (90 × 15 mm) que contenían medio Czapek Dox. En seguida, se incubaron a 28±1 °C por 10 d. Justo a los 10 días, en el centro de la caja de Petri, se situó un explante de PDA de 6 mm de diámetro con crecimiento del hongo (micelio y conidios) de *F. kuroshium* con 7 d de edad y se incubaron nuevamente a 28±1 °C (Fig. 14). El crecimiento radial del patógeno (*F. kuroshium*) en las confrontaciones se midió cada 24 h hasta que el patógeno testigo (*F. kuroshium* solo) llenó por completo la caja de Petri. La inhibición del crecimiento radial (ICR) del patógeno fue medida usando la siguiente fórmula:  $ICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$ , donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en la confrontación (Ezziyani *et al.* 2004).

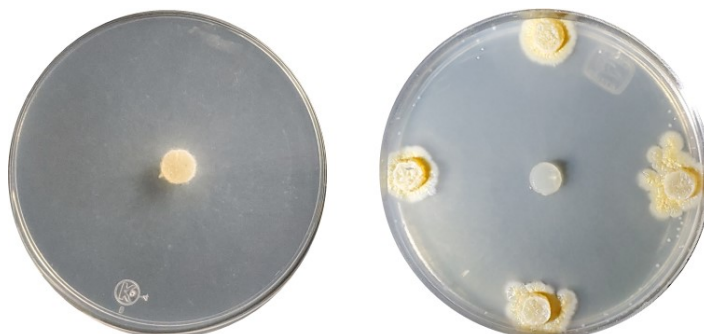


Figura 14. Actividad antagónica de *Streptomyces* spp contra *F. kuroshium* por confrontación dual. Izquierda. Testigo positivo (explante de *F. kuroshium*). Derecha. *Streptomyces* sp. vs *F. kuroshium*.

La actividad antifúngica *in vitro* de los COVs emitidos por las cepas de *Streptomyces* spp. contra *F. kuroshium* se llevó a cabo mediante la técnica de fondos cubiertos, se colocó un explante de 6 mm de diámetro de la cepa de *Streptomyces* spp., en el centro de una caja de Petri (90 × 15 mm) y en otra caja, se colocó un explante de 6 mm de diámetro de *F. kuroshium*, se unieron los fondos (sin tapa) de ambas cajas de Petri y se sellaron con Parafilm. Se incubaron a 28 °C por 3 d y se midió el crecimiento radial. Como testigo, se colocó en el centro de una caja de Petri (90 × 15 mm) un explante de 6 mm del fitopatógeno y se unió con el fondo de una caja de Petri sin explante de antagonista (Yang *et al.* 2019).

#### **Promoción del crecimiento *in vitro* de plántulas de arábido**

La habilidad de compuestos volátiles (COVs) emitidos por las cepas de *Streptomyces* spp se evaluó para promover el crecimiento *in vitro* de plántulas de *A. thaliana*. Para este propósito, las semillas de *A. thaliana* se desinfectaron previamente mediante lavados de 5 min, tres con hipoclorito de sodio al 3%, uno con alcohol al 70%, y tres con agua destilada estéril. Una vez lavadas y secas las semillas, se colocaron tres en cada caja de Petri de (90 × 15 mm) divididas, en el área que contenía el medio Murashige y Skoog (MS) y Phytigel (4.4 y 5 g/L, respectivamente), mientras que en el lado opuesto que contenía el medio Czapek Dox se inoculó la cepa de *Streptomyces* (200 µL de un pre-cultivo con 3 d de crecimiento en caldo ISP2), después de haber germinado las semillas de

arabidopsis ( $\approx 3$  días) (Figura 15). Las cajas de Petri se colocaron en un ángulo de  $65^\circ$  y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16:8 h luz/obscuridad por 15 d.

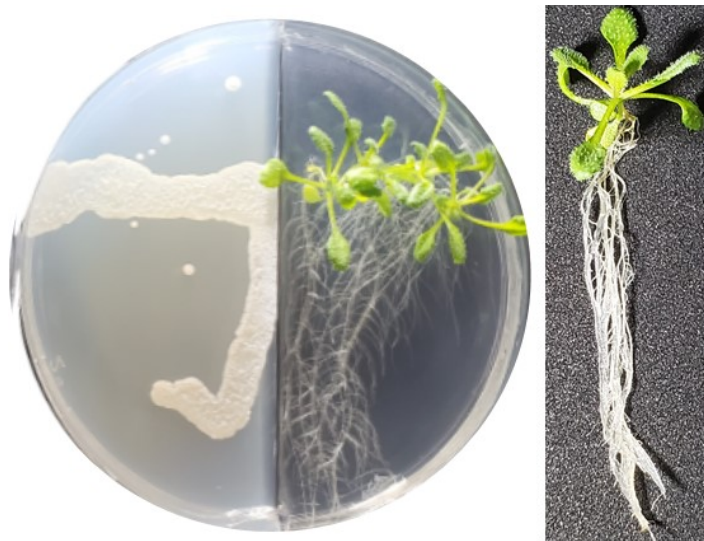


Figura 15. Plántulas de *A. thaliana*. A) Crecidas en cajas de Petri sin división y B) crecidas en cajas de Petri con división.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las pruebas bioquímicas cualitativas y cuantitativas consistieron en al menos tres repeticiones experimentales. Las pruebas de antagonismo *in vitro* (*Streptomyces* vs *F. kuroshium*) consistieron en 10 repeticiones. Las pruebas de promoción de crecimiento *in vitro* de *A. thaliana* consistieron en nueve repeticiones. Los datos de ICR, y los parámetros de crecimiento medidos en plántulas de *A. thaliana* se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) usando el Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002), y la separación de medias se realizó mediante la prueba Tukey ( $p= 0.05$ ).

## RESULTADOS

### **Caracterización bioquímica de las cepas de *Streptomyces* spp.**

Los resultados de la caracterización bioquímica de las tres cepas de cepas de *Streptomyces* spp. se muestran en el Cuadro 2. Las tres cepas fueron capaces de producir AIA y sideróforos (Cuadro 2). Ambos compuestos implicados en la promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, fueron incapaces de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos. La cepa *S. cellostaticus* (IA32) fue la que produjo la mayor cantidad de AIA (13.67 mg/L). Mientras que la cepa *Streptomyces lactacystinicus* (AI07)\* fue la que produjo la mayor cantidad de sideróforos (34.17 %U). La mayoría de las cepas de *Streptomyces*, además de ser excelentes agentes de biocontrol de fitopatógenos, también sintetizan compuestos como fitohormonas (AIA) y sideróforos, implicados en la promoción del crecimiento de las plantas (Gupta *et al.* 2015; Kaewkla y Franco, 2021; Wahyudi *et al.* 2019). Nuestros resultados coinciden con los valores reportados en otros estudios para actinobacterias estreptomicetos y no estreptomicetos con valores que van desde 2 hasta 48.6%U de sideróforos (García-Rojas *et al.* 2019; Chukwuneme *et al.* 2020; Lahmyed *et al.* 2021). Mientras que en actinomicetos se han reportado rangos de producción de AIA moderados de 0.2 a 136 mg/L (Narayana *et al.* 2009; Nimnoi *et al.* 2010). Sreevidya *et al.* (2016) y se ha sugerido que el mecanismo más común para la biosíntesis de esta auxina por los actinomicetos se lleva a cabo a través de la ruta metabólica del ácido indol-3-pirúvico e indol 3-aldehído acético, por consecuencia, el aumento en estas vías metabólicas implica un aumento en la síntesis de AIA (Shilev, 2013). Se ha demostrado que la capacidad que tienen los actinomicetos para promover el crecimiento de las plantas de diversos cultivos, está dada por su habilidad para producir sideróforos, fitohormonas (p.e. AIA) y a su capacidad para fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos (Monteiro *et al.* 2017).

Cuadro 2. Sustancias producidas por cepas de *Streptomyces* spp implicadas en la promoción del crecimiento de las plantas

Cepa de <i>Streptomyces</i>	Sustancias promotoras del crecimiento vegetal			
	Fijación de N	Solubilización de fosfatos (mg/mL)	Producción de AIA (mg/L)	Producción de sideróforos (%U)
<i>Streptomyces lactacystinicus</i> (AI07)	-	-	6.67	34.17
<i>S. cellostaticus</i> (IA32)	-	-	13.67	22.41
<i>S. mauvecolor</i> (IA104)	-	-	7.33	18.14

#### Actividad biológica *in vitro* de *Streptomyces* spp. contra *Fusarium kuroshium*

Al evaluar la actividad antifúngica *in vitro* por confrontación directa y a través de volátiles de las tres cepas de *Streptomyces* (*S. lactacystinicus*, *S. cellostaticus* y *S. mauvecolor*), se registraron inhibiciones del crecimiento de *F. kuroshium* de 51.18 a 64.51% por confrontación dual (directa) y de 58.42 a 66.46% a través de los volátiles emitidos por las cepas de *Streptomyces* spp., siendo *S. lactacystinicus* la cepa que mostró la mayor inhibición al ser confrontado por ambas técnicas (Figuras 16 y 17). Un número considerable de cepas de *Streptomyces* han sido reportadas con capacidad anti-fitopatogénica, esta actividad antagónica se le ha atribuido a su capacidad para producir múltiples compuestos bioactivos (volátiles y no volátiles) (Toumatia *et al.* 2015; Barka *et al.* 2016). Un gran número de cepas de *Streptomyces* han demostrado su capacidad para inhibir *in vitro* el crecimiento de fitopatógenos mediante confrontaciones duales (García-Rojas *et al.* 2019; Pérez Corral *et al.* 2022). Además de ser capaces de sintetizar COVs implicados en la

inhibición de fitopatógenos, incluido el género *Fusarium* (Yang *et al.* 2019; Pérez-Corral *et al.* 2020).

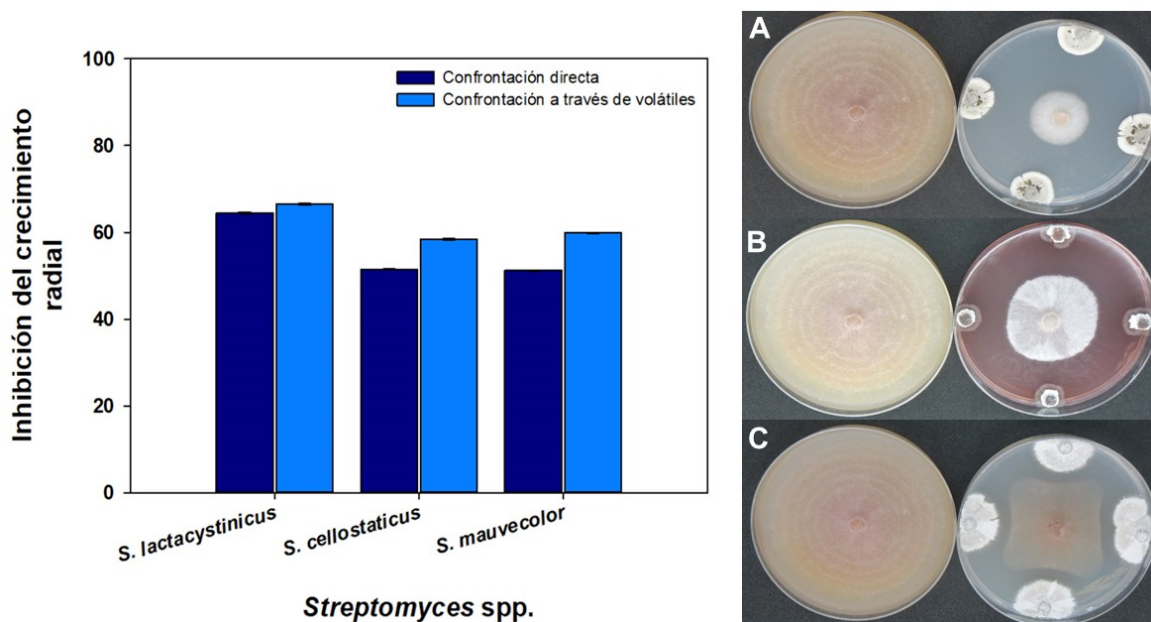


Figura 16. Izquierda. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium kuroshium* por cepas de *Streptomyces* spp., mediante confrontación dual (directa) y a través de volátiles emitidos por *Streptomyces*. Derecha. Apariencia de la inhibición del crecimiento micelial de *F. kuroshium* por confrontación directa.

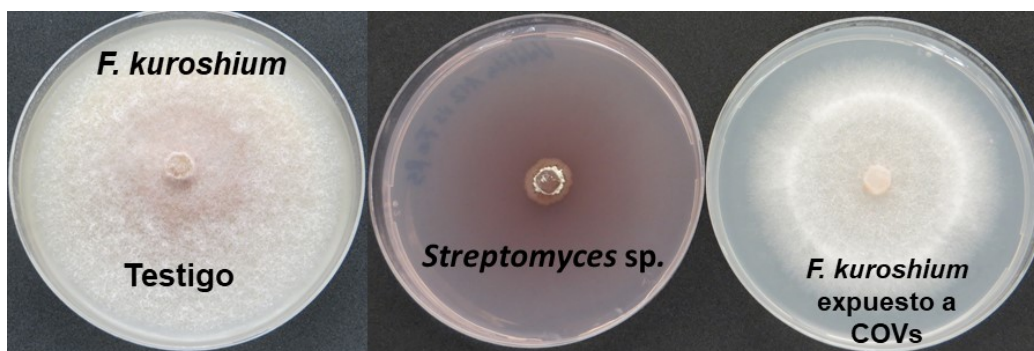


Figura 17. Apariencia de la inhibición del crecimiento micelial de *F. kuroshium* por confrontación a través de los compuestos volátiles emitidos por las cepas de *Streptomyces*.

### Promoción del crecimiento *in vitro* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La longitud de raíces, el peso fresco de la planta y el peso fresco de las raíces en plántulas de *A. thaliana* aumentó significativamente después de la exposición a los

COVs emitidos por las tres cepas de *Streptomyces* (Cuadro 3, Figura 18). Las raíces de las plántulas de *arabidopsis* fueron más alargadas (>11 mm) que la plántulas testigo. Tanto el peso fresco de la planta como el peso fresco de la raíz fueron incrementados hasta en 3 y 3.8 veces más que las plántulas testigo, al ser expuestas a los COVs de *S. lactacystinicus*. Mientras que el número de hojas no se vio influenciada por los COVs de las tres cepas de *Streptomyces* probadas.

Cuadro 3. Efecto *in vitro* de algunas cepas de microorganismos benéficos algunos parámetros de crecimiento *in vitro* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Parámetros de crecimiento/Cepas de actinomicetos	<i>Streptomyces</i> spp.			Plantas testigo
	S.	S.	S.	
	<i>lactacystinicus</i> (IA07)	<i>cellostaticus</i> (IA32)	<i>mauvecolor</i> (IA104)	
Longitud raíz primaria (mm)	60.38 ± 3.8ab*	63.86 ± 3.56a	60.38 ± 1.75ab	49.21 ± 5.01b
Número de hojas	8.11 ± 0.12a	7.89 ± 0.19ab	7.33 ± 0.33ab	7.44 ± 0.38ab
Peso fresco planta (mg)	23.24 ± 3.95a	20.19 ± 3.28a	18.98 ± 4.33a	7.34 ± 0.59b
Peso fresco raíz (mg)	13.46 ± 1.49a	11.94 ± 2.64ab	9.3 ± 2.1abc	3.50 ± 0.62c

\*Medias con las mismas literales entre hileras son estadísticamente similares. ± indican la desviación estándar de las medias.

La gran mayoría de las cepas de *Streptomyces* tienen la capacidad de sintetizar COVs implicados en la promoción del crecimiento vegetal (Pérez-Corral *et al.* 2022). De acuerdo con algunos autores, los COVs favorecen indirectamente el desarrollo de la planta, al ser detectados por las mismas (Zhang *et al.* 2007; Gutiérrez-Luna *et al.* 2010). Se ha sugerido que este efecto positivo de promoción en *A. thaliana* podría atribuirse a la acción conjunta de los COVs producidos por cada cepa de

actinomiceto. Jiang *et al.* (2019) demostraron la capacidad de algunos COVs para promover el crecimiento en *A. thaliana*, reportando aumentos especialmente en el peso fresco de las plantas.



Figura 18. Apariencia de plántulas de *Arabidopsis thaliana* expuestas *in vitro* a compuestos volátiles (COVs) emitidos por cepas de *Streptomyces* spp. Izquierda. Plántula de arabidopsis usada como testigo. Derecha. Plántula de arabidopsis evidenciando la mayor acumulación de biomasa de raíces y de pelos radicales inducidos por los compuestos volátiles emitidos por *Streptomyces cellostaticus* (cepa IA32).

## CONCLUSIONES

Las tres cepas de *Streptomyces* fueron capaces de producir sideróforos y ácido 3 – indol acético, pero fueron incapaces de fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos.

Las tres cepas de *Streptomyces* spp inhibieron exitosamente el crecimiento *in vitro* del hongo *Fusarium kuroshium* mediante confrontación dual y a través de volátiles emitidos por las cepas de *Streptomyces*.

Las tres cepas de *Streptomyces* fueron capaces de mejorar algunos de los parámetros de crecimiento *in vitro* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, especialmente peso fresco de la planta, peso fresco de la raíz y longitud de las raíces primarias.

Las cepas de *Streptomyces* de este estudio tienen potencial para ser usados como agentes de biocontrol de *Fusarium kuroshium* y como biofertilizantes.

## RECOMENDACIONES

Basado en la capacidad de las cepas de *Streptomyces* de este estudio para inhibir a *Fusarium kuroshium*, producir compuestos (ej. AIA, sideróforos) implicados en el crecimiento de las plantas y promover el crecimiento en plántulas de *Arabidopsis* mediante los COVs emitidos por *Streptomyces*, se sugiere conducir estudios en condiciones de invernadero. Además se sugiere, identificar los COVs emitidos por estas cepas de *Streptomyces* y dilucidar cuales son aquellos responsables de inhibir el crecimiento del fitopatógeno y de promover el crecimiento vegetal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K.A., Ghramh, H.A., Huang, Z., Chen H.Y.H. and Lu, G.D. 2019. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis*. 129: 7–18.
- Ahmad, B., Nigar, S., Malik, N.A., Bashir, S., Ali, J., Yousaf, S., Bangash, J.A. and Jan I. 2013. Isolation and characterization of cellulolytic nitrogen fixing *Azotobacter* species from wheat rhizosphere of Khyber Pakhtunkhwa. *World Applied Sciences Journal*. 27(1): 51-60.
- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 12(1): 39-45.
- Baltz, R. H. 2007. Antimicrobials from Actinomycetes: back to the future. *Microbe*, 2: 125-133.
- Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P. Clément, C., Ouhdouch, Y. and van Wezel, G.P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 80(1): 1-43
- Batra, L. R. 1967. Ambrosia fungi: A taxonomic revision and nutritional studies of some species. *Mycologia*. 59: 976-1017.
- Batra, L. R. 1963. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. *Transactions of the Kansas Academy of Science*. 66: 213–236.
- Bhatti, A.A., Haq, S., and Bath, R.A. 2017. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*. 111: 458-467.
- Boland, J.M. 2016. The impact of an invasive ambrosia beetle on the riparian habitats of the Tijuana River Valley, California. *PeerJ* 4:e2141.
- Boland, J.M. 2018. The Kuroshio Shot Hole Borer in the Tijuana River Valley in 2017-18 (Year Three): Infestation Rates, Forest Recovery, and a New Model. Final Report for US Navy, US Fish and Wildlife Service and Southwest Wetlands Interpretive Association, 74. Available at <http://trnerr.org/wp-content/uploads/2018/07/Boland-KSHB-April2018-FINAL.pdf>. Consultado en septiembre de 2022.

- Boland, J.M. and Woodward, D.L. 2019. Impacts of the invasive shot hole borer (*Euwallacea kuroshio*) are linked to sewage pollution in southern California: the Enriched Tree Hypothesis. *PeerJ* 7:e6812.
- Brown, J., Ogle, H. and Dale, M. 1997. Disease management: general concepts. *Plant pathogens and plant diseases. Rockvale Publications, Armidale, NSW, Australia*, 43-358.
- Browne, F. G. 1961. The biology of Malayan Scolytidae and Platypodidae. *Malayan Forest Records*. 22: 1-255.
- Carrillo, D., R.E. Duncan, and J.E. Peña. 2012. Ambrosia beetles (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) that breed in avocado wood in Florida. *Florida Entomologist*. 95(3): 573-579.
- Carrillo, J.D., Dodge, C., Stouthamer, R. and Eskalen, A. 2020. Fungal symbionts of the polyphagous and Kuroshio shot hole borers (Coleoptera: Scolytinae, *Euwallacea* spp.) in California can support both ambrosia beetle systems on artificial media. *Symbiosis*. 80: 155–168.
- Cartieaux, F., Contesto, C., Gallou, A., Desbrosses, G., Kopka, J., Taconnat, L., Renou, J.P. and Touraine, B. 2008. Simultaneous Interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. Strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Leads to Complex Transcriptome Changes. *Molecular Plant-microbe Interactions*. 21(2): 244-259.
- Castrejón-Antonio, J.E., Tamez-Guerra, P., Montesinos-Matías, R., Ek-Ramos, M.J., Garza-López, P.M. and Arredondo-Bernal, H.C. 2020. Selection of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) strains to control *Xyleborus affinis* (Curculionidae: Scolytinae) females. *PeerJ* 8:e9472.
- Castrillo, L.A., Griggs, M.H., and Vandenberg, J.D. 2016. Competition between biological control fungi and fungal symbionts of ambrosia beetles *Xylosandrus crassiusculus* and *X. germanus* (Coleoptera: Curculionidae): mycelial interactions and impact on beetle brood production. *Biological Control*. 103: 138–146.
- Chaurasia, A., Meena, B. R., Tripathi, A. N., Pandey, K. K., Rai, A. B. and Singh, B. 2018. Actinomycetes: an unexplored microorganisms for plant growth promotion

- and biocontrol in vegetable crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34(9): 132.
- Chukwuneme, C.F., Babalola, O.O., Kutu, F.R. and Ojuederie, O.B. 2020. Characterization of actinomycetes isolates for plant growth promoting traits and their effects on drought tolerance in maize. *Journal of Plant Interactions*. 15(1): 93-105.
- CISR (Center for Invasive Species Research). 2012. Tea shot Hole Borer (*Euwallacea fornicatus*) and Fusarium Dieback (*Fusarium* sp.). UCR. Disponible en línea: <http://cizr.ucr.edu/tea-shot-hole-borer.html>. Consultado en septiembre de 2022.
- Coleman, T.W., Eskalen, A. and Stouthamer, R. 2013. New pest complex in California: The polyphagous shot hole borer, *Euwallacea* sp., and fusarium dieback, *Fusarium euwallaceae*. United States Department of Agriculture. Disponible en línea: <https://cizr.ucr.edu/pdf/pest-alert-pshb-and-fd.pdf>. Consultado en septiembre de 2022.
- Creissen, H. E., Jorgensen, T.H. and Brown, J.K.M. 2016. Impact of disease on diversity and productivity of plant populations. *Functional Ecology*. 30: 649-657.
- Cruz, L. F., Cruz, J. C., Carrillo, D., Mtz-Enriquez, A. I., Lamelas, A., Ibarra-Juarez L. A. and Pariona, N. 2021. *In-vitro* evaluation of copper nanoparticles as a potential control agent against the fungal symbionts of the invasive ambrosia beetle *Euwallacea fornicatus*. *Crop Protection*. 143: 105564.
- Danthanarayana, W. 1968. The distribution and host-range of the shot-hole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. *Tea Quarterly*. 39: 61–69.
- Dávila-Medina, M.D., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo, F.D., Ochoa-Fuente, Y.M. and Flores-Olivas, A. 2013. Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4(8): 1187-1196.
- De Costa, D.M. and Erabadupitiya, H.R.U.T. 2005. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*. 36(1): 31-39.

- de Oliveira-Longatti, S.M., Marra, L.M., Lima-Soares, B., Bomfeti, C.A., da Silva, K., Avelar-Ferreira, P.A. and de Souza Moreira, F.M. 2014. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(4): 1239-1250.
- Demain, A.L. and Sanchez, S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*. 62(1): 5-16.
- Dimson, M., Kabashima, J. and Eskalen, A. 2015. Polyphagous Shot Hole Borer + Fusarium Dieback: Identifying Symptoms and Look-Alike Pests. [Brochure]. n.c.: University of California Agriculture and Natural Resources.
- Dunlap, C.A., Lueschow, S., Carrillo, D., and Rooney, A.P. 2017. Screening of bacteria for antagonistic activity against phytopathogens of avocados. *Plant Gene*. 11: 17–22.
- Eskalen, A. 2022. Polyphagous Shot Hole Borer. University of California. Center for Invasive Species Research, University of California, Riverside. Disponible en línea: <https://cizr.ucr.edu/invasive-species/polyphagous-shot-hole-borer>. Consultado en septiembre de 2022.
- Eskalen, A., Kabashima, J. and Dimson, M. 2014. Polyphagous Shot Hole Borer+ Fusarium Dieback Field Identification Guide. University of California. *Agriculture and Natural Resources*. 47: 777-780. Disponible en línea: <https://capca.com/wp-content/uploads/2018/07/fieldidentificationguide.pdf>. Consultado en agosto de 2022.
- Eskalen, A., Kabashima, J., Dimson, M. and Lynch, S. 2018. Invasive Shot-Hole Borer and Fusarium Dieback Field Guide. Identifying Polyphagous and Kuroshio Shot-Hole Borer in California. University of California. Agriculture and Natural Resources. Disponible en línea: <https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8590.pdf>. Consultado en septiembre de 2022.
- Eskalen, A., Stouthamer, R., Lynch, S.C., Rugman-Jones, P.F., Twizeyimana, M., Gonzalez, A. and Thibault, T. 2013. Host range of Fusarium dieback and its ambrosia beetle (Coleoptera: scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease*. 97: 938–951.

- Ezziyyani, M., Sánchez, C.P., Requena, M.E., Rubio, L. and Castillo, M.E.C. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*–Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26: 61-68.
- Faccoli, M., Gallegi, D., Branco, M., Brockerhoff, E.G., Corley, J., Coyle, D.R., Hurley, B.P., Jactel, H. et al. 2020. A first worldwide multispecies survey of invasive Mediterranean pine bark beetles (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). *Biol. Invas.* 22: 1785-1799.
- Fraedrich, S.W., Harrington, T.C., Rabaglia, R.J., Ulyshen, M.D., Mayfield Iii, A.E., Hanula, J.L. and Miller, D.R. 2008. A fungal symbiont of the redbay ambrosia beetle causes a lethal wilt in redbay and other Lauraceae in the southeastern United States. *Plant Disease*. 92(2): 215-224.
- Franco-Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X. and Barea, J.M. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology*. 45(3): 209-217.
- Freeman, S., Protasov, A., Sharon, M., Mohotti, K., Eliyahu, M., Okon-Levy, N., Maymon, M. and Mendel, Z. 2012a. Obligate feed requirement of *Fusarium* sp. nov., an avocado wilting agent, by the ambrosia beetle *Euwallacea* aff. *fornicata*. *Symbiosis*. 58: 245-251
- Freeman, S., Sharon, M., Maymon, M., Mendel, Z., Protasov, A., Aoki, T., Eskalen, A. and O'Donnell, K. 2013. *Fusarium Euwallaceae* sp. nov.-a symbiotic fungus of *Euwallacea* sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. *Mycologia* 105(6): 1595-1606.
- Freeman, S., Sharon, M., Okon-Levy, N., Protasov, A., Eliyahu, M. and Mendel, Z. 2012b. *Fungicide Screening for Inhibition of the Fungal Symbiont Fusarium sp. nov. in Israel*. Disponible en línea: [http://www.avocadosource.com/Journals/IABC\\_2012/S5\\_04\\_Freeman.pdf](http://www.avocadosource.com/Journals/IABC_2012/S5_04_Freeman.pdf). Citado en septiembre de 2022.
- García-Ávila, C.J., Trujillo-Arriaga, F. J., López- Buenfil, J.A., González-Gómez, R., Carrillo, D., Cruz, L.F., RuizGalván, I., Quezada-Salinas A. and Acevedo-Reyes,

- N. 2016. First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in México. *Florida Entomologist*. 99(3): 555-556.
- García-Rojas, D.E., Vázquez-Vázquez, P., Pérez-Corral, D.A., Ruiz-Cisneros, M.F., Berlanga-Reyes, D.I., de Jesús Ornelas-Paz, J., Acosta-Muñiz, C.H., Rios-Velasco, C., Salas-Marina, M.A. and Osorio-Hernández, E. 2019. *Streptomyces* as *in vitro* biocontrol agents of *Exserohilum rostratum* and producers of plant growth promoting substances. *Mexican Journal of Phytopathology*. 37(1): 48-56.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. In: Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G., Höfte, M., Lemanceau, P., Cooke, B.M. (eds) *New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research*. Springer, Dordrecht.
- Gomez, D.F., Skelton, J., Steininger, M.S., Stouthamer, R., Rugman-Jones, P., Sittichaya, W., Rabaglia, R.J. and Hulcr, J. 2018. Species delineation within the *Euwallacea forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) complex revealed by morphometric and phylogenetic analyses. *Insect Systematics and Diversity*. 2(6): 1–11.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Suzuki, K.-i., Ludwig, W., et al. 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 33-2028): Springer New York.
- Gopalakrishnan, S., Vadlamudi, S., Bandikinda, P., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Rupela, O., Kudapa, H., Katta, K. and Varshney, R.K. 2014. Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research*. 169(1): 40-48.
- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, A.C.N. and Martins, I.S. 1997. Releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*. 21(3): 183-187.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S. K. and Singh, V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 7(2): 096-102.

- Gutiérrez-Luna, F.M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., de la Cruz, H.R. and Macías-Rodríguez, L. 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*. 51(1): 75-83.
- Hanula, J.L. and Sullivan, B. 2008. Manuka oil and phoebe oil are attractive baits for *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Scolytinae), the vector of laurel wilt. *Environmental Entomology*. 37(6): 1403-1409.
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., Fortas, Z. and Pogni, R. 2018. *Streptomyces* secondary metabolites. In Basic Biology and Applications of Actinobacteria (Edited by Enany S.). 6: 99–122.
- Harrington, C.T., Yun, Y.H., Lu, S.S., Goto, H., Aghayeva, N.D. and Fraedrich, W.F. 2011. Isolations from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, confirm that the laurel wilt pathogen, *Raffaelea lauricola*, originated in Asia. *Mycologia*. 103(5): 1028-1036.
- Harrington, T.C., Fraedrich, S. and Aghayeva, D.N. 2008. *Raffaelea lauricola*, a new ambrosia beetle symbiont and pathogen on the Lauracea. *Mycotaxon*. 104: 399-404.
- Hulcr, J. and Stelinski, L.L. 2017. The ambrosia symbiosis: from evolutionary ecology to practical management. *Annual Review of Entomology*. 62(1): 285–303.
- Hulcr, J., Dole, S.A., Beaver, R.A., and Cognato, A.I. 2007. Cladistic review of generic taxonomic characters in Xyleborina (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Systematic Entomology*. 32: 568–584.
- Jiang, C.-H., Xie, Y.-S., Zhu, K., Wang, N., Li, Z.-J., Yu, G.-J. and Guo, JH. 2019. Volatile organic compounds emitted by *Bacillus* sp. JC03 promote plant growth through the action of auxin and strigolactone. *Plant Growth Regulation*. 87(2): 317-328.
- Jones, M.E, and Paine, T.D. 2015. Effect of chipping and solarization on emergence and boring activity of a recently introduced ambrosia beetle (*Euwallacea* sp., Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) in southern California. *Journal of Economic Entomology*. 108: 1852–1859.

- Jones, M.E. and Paine, T.D. 2018. Potential pesticides for control of a recently introduced ambrosia beetle (*Euwallacea* sp.) in southern California. *Journal of Pest Science*. 91: 237-246.
- Kaewkla, O. and Franco, C.M.M. 2021. *Amycolatopsis pittospori* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from native apricot tree and genome mining revealed the biosynthesis potential as antibiotic producer and plant growth promoter. *Antonie van Leeuwenhoek*. 114(4): 365-377.
- Karimi, E., Sadeghi, A., Abbaszadeh Dahaji, P., Dalvand, Y., Omidvari, M. and Kakuei Nezhad, M. 2012. Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root rot of sugar beet. *Biocontrol Science Technology*. 22(3): 333-349.
- Kasson, M. T., O'Donnell, K., Rooney, A. P., Sink, S., Ploetz, R. C., Ploetz, J. N., et al. 2013. An inordinate fondness for *Fusarium*: Phylogenetic diversity of fusaria cultivated by ambrosia beetles in the genus *Euwallacea* on avocado and other plant hosts. *Fungal Genetics and Biology*. 56: 147–157.
- Kekuda, T.P., Shobha, K. and Onkarappa, R. 2010. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *Journal of Pharmacy Research*. 3(2): 250-256.
- Kirkendall, L. R. and Faccoli, M. 2010. Bark beetles and pinhole borers (Curculionidae, Scolytinae, Platypodinae) alien to Europe. *Zookeys*. 56: 227–251.
- Koch, F.H. and Smith, W.D. 2008. Spatio-temporal analysis of *Xyleborus glabratus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) invasion in eastern US forests. *Environmental Entomology*. 37(2): 442-452.
- Lahmyed, H., Bouharroud, R., Quessaoui, R., Ajerrar, A., Amarraque, A., Aboulhassan, M.A. and Chebli, B. 2021. Actinomycetes biocontrol agents against *Botrytis cinerea*, agent of tomato gray mold disease. *Kuwait Journal of Science*. 48(3): 1-8.
- Lee, J., Postmaster, A., Soon, H.P., Keast, D. and Carson, K.C. 2012. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *BioMetals*. 25(2): 285-296.

- Leveau, J.H.J., y Lindow, S.E. 2005. Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5): 2365-2371.
- López-Buenfil, J.A., González-Gómez, R., Montiel-Castelán, J.M., Laureano-Ahuelicán, B., Díaz-López, J., Álvarez-Castañeda, J. and Estrada-Venegas, E.G. 2017. Estrategias de vigilancia epidemiológica de los complejos de escarabajos ambrosiales *Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola* y *Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae*, en aguacate en México. Memorias del V Congreso Latinoamericano del Aguacate. Pp. 109-113. Disponible en línea: [http://www.avocadosource.com/journals/memorias\\_vcla/2017/memorias\\_vcla\\_2017\\_pg\\_109.pdf](http://www.avocadosource.com/journals/memorias_vcla/2017/memorias_vcla_2017_pg_109.pdf).
- Lorea-Hernández, F.G. 2002. La familia Lauraceae en el sur de México: Diversidad, distribución y estado de conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 71: 59-70.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1): 541-556.
- Lynch, S. C., Twizeyimana, M., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Na, F., Kayim, M., Kasson, M.T., Thu, P.Q., Bateman, C., Rugman-Jones, P., Hulcr, J., Stouthamer, R. and Eskalen, A. 2016. Identification, pathogenicity and abundance of *Paracremonium pembeum* sp. nov. and *Graphium euwallaceae* sp. nov.— two newly discovered mycangial associates of the polyphagous shot hole borer (*Euwallacea* sp.) in California. *Mycologia*. 108: 313–329.
- Maloy, O.C. 2005. Plant Disease Management. Spanish translation by José Carlos Ureta R. and Luisa Santamaria, 2016. *The Plant Health Instructor*.
- Mann, R., Hulcr, J., Peña, J. and Stelinski, L. 2011. Redbay ambrosia beetle (*Xyleborus glabratus* Eichhoff (Insecta: Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Featured creatures. University of Florida. Disponible en línea: <http://entnemdept.ufl.edu/creatures/tres/beetles/redbay-ambrosia-beetle.htm>. Consultado en septiembre de 2022.

- Marian, M. and Shimizu, M. 2019. Improving performance of microbial biocontrol agents against plant diseases. *Journal of General Plant Pathology*. 85: 1-8.
- Mayfield, A.E.III., Barnard, E.L., Smith, J.A., Bernick, S.C., Eickwort, J.M., and Dreaden, T.J. 2008. Effect of propiconazole on laurel wilt disease development in redbay trees and on the pathogen *in vitro*. *Arboriculture and Urban Forestry*. 34 (5): 317–324.
- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M. and Hatfield, H.L. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of *Streptomyces* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 4(1): 79-91.
- Mendel, Z., Protasov, A., Sharon, M., Zveibil, A., Ben S., Yehuda, O'Donnell, K., Rabaglia, R., Wysoki, M. and Freeman, S. 2012. An Asian ambrosia beetle *Euwallacea fornicatus* and its novel symbiotic fungus *Fusarium* sp. pose a serious threat to the Israeli avocado industry. *Phytoparasitica*. 40: 235-238.
- Monteiro, P., Borba, M.P. and Van Der Sand, S.T. 2017. Evaluation of the antifungal activity of *Streptomyces* sp. on *Bipolaris sorokiniana* and the growth promotion of wheat plants. *The Journal of Agricultural Science*. 9(12): 229-240.
- Na, F., Carrillo, J.D., Mayorquin, J.S., Ndinga-Muniania, C., Stajich, J.E., Stouthamer, R., Huang, Y.T., Lin, Y.T., Chen, C.Y. and Eskalen A. 2018. Two novel fungal symbionts *Fusarium kuroshium* sp. nov. and *Graphium kuroshium* sp. nov. of Kuroshio shot hole borer (*Euwallacea* sp. nr. *fornicatus*) cause Fusarium dieback on woody host species in California. *Plant Disease*. 102: 1154-1164.
- NAPPO. 2016. Detección del escarabajo barrenador *Euwallacea* sp. y su hongo simbiote *Fusarium euwallaceae*, en zonas urbanas de Tijuana, Baja California, México. Phytosanitary Alert System. Official Pest Reports. North American Plant Protection Organization (NAPPO). Disponible en línea: <https://prod.senasica.gob.mx/ALERTAS/inicio/pages/single.php?noticia=2013>. Consultado en septiembre de 2022.

- Narayana, K.J., Peddikotla, P., Krishna, P.S.J., Yenamandra, V. and Muvva, V. 2009. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of Biological Research*. 11: 49-55.
- Nimnoi, P., Pongsilp, N. and Lumyong, S. 2010. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(2): 193-203.
- Oliver, R. P. and Hewitt, H. G. 2014. Fungicides in Crop Protection. 2<sup>nd</sup> edition. CABI Publishing, CAB International.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L. and López-Bucio, J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*. 4(8): 701-712.
- Paine, T.D., Hanlon, C.C., and Byrne, F.J. 2011. Potential risks of systemic imidacloprid to parasitoid natural enemies of a cerambycid attacking *Eucalyptus*. *Biological Control*. 56: 175–178.
- Pérez-Corral, D.A., Ornelas-Paz, J.d.J., Olivas-Orozco, G.I., Acosta-Muñiz, C. H., Salas-Marina, M. Á., Ruiz-Cisneros, M. F., Molina-Corral, F.J., Fernández-Pavía, S.P. and Rios-Velasco, C. 2020. Antagonistic effect of volatile and non-volatile compounds from *Streptomyces* strains on cultures of several phytopathogenic fungi. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 32(12): 879-889.
- Pérez-Corral, D.A., Ornelas-Paz, J.J., Olivas-Orozco, G.I., Acosta-Muñiz, C.H., Salas-Marina, M.Á., Berlanga-Reyes, D.I., Ruiz-Cisneros, M.F. and Rios-Velasco, C. 2022a. Molecular, morphological and biochemical characterization of actinomycetes and their antagonistic activity against phytopathogenic fungi. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 45 (1): 103- 115.
- Pérez-Corral, D.A.; Ornelas-Paz, J.d.J.; Olivas, G.I.; Acosta-Muñiz, C.H.; Salas-Marina, M.Á.; Berlanga-Reyes, D.I.; Sepúlveda, D.R.; Mares-Ponce de León, Y.; Rios-Velasco, C. 2022b. Growth Promotion of *Phaseolus vulgaris* and *Arabidopsis thaliana* Seedlings by Streptomyces Volatile Compounds. *Plants*, 11, 875.
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P. and Macías-Rodríguez, L. 2017. *Bacillus*

- methylophilus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*. 254(6): 2201-2213.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F.J., Ollero, F.J. and Cubo, T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169(5): 325-336.
- Pimentel, D., Lach, L. Zúñiga, R. and Morrison, D. 2000. Environmental and economic costs of nonindigenous species in the United States. *Bioscience*. 50 (1): 53-65.
- Pimentel, D., Zúñiga, R. and Morrison, D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*. 52: 273-288.
- Poveda, J. 2021. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: new uses for a mycoparasite. *Biological Control*. 159: 104634.
- Rabaglia, R. 2008. *Xyleborus glabratus*. Exotic Forest Pest Information System for North America. En: <http://spfnic.fs.fed.us/exfor/data/pestreports.cfm?pestidval=148&langdisplay=english>. Consultado en septiembre de 2022.
- Rabaglia, R. J., Dole, S.A. and Cognat, A.I. 2006. Review of American *Xyleborina* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) occurring North of Mexico, with an illustrated key. *Annals of the Entomological Society of America*. 99: 1034-1056.
- Rafa, K. F., Grégoire, J.C. and StefanLindgren, B. 2015. Economics and politics of bark beetles. In *Bark Beetles. Biology and Ecology of Native and Invasive Species* (eds Fernando, E. V. & Richard, W. H.) 585–614 (Elsevier, New York).
- Ranger, C. M., Dzurenko, M., Barnett, J., Geedi, R., Castrillo, L., Ethington, M., Ginzl, M., Adesso, K. and Reding, M.E. 2021. Electrophysiological and behavioral responses of an ambrosia beetle to volatiles of its nutritional fungal symbiont. *Journal of Chemical Ecology*. 47: 463-475.

- Reverchon, F., Contreras-Ramos, S.M., Eskalen, A., Guerrero-Analco, J.A., Quiñones-Aguilar, E.E., Rios-Velasco, C. and Velázquez-Fernández, J.B., 2021. Microbial biocontrol strategies for ambrosia beetles and their associated phytopathogenic fungi. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 5: 737977.
- Reverchon, F., García-Quiroz, W., Guevara-Avendaño, E., Solís-García, I.A., Ferrera-Rodríguez, O. and Lorea-Hernández, F. 2019. Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against *Fusarium* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 50: 583–592.
- Sahib, N.K., Kularatne, N.S., Kumar, S. and Karunaratne, V. 2008. Effect of (+)-usnic acid on the shothole borer (*Xyleborus fornicatus* Eichh.) of tea. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*. 36 (4): 335-336).
- SAS, Institute. 2002. SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160(1): 47-56.
- SEMARNAT-CONAFOR. 2019. Programa de monitoreo del complejo de escarabajos ambrosiales exóticos. *Euwallacea* sp.-*Fusarium euwallaceae* y *Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola*. Sanidad Forestal. Sistema Integral de Vigilancia y Control Fitosanitario Forestal (SIVICOFF). Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Disponible en línea: [http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/03%20Plagas%20bajo%20vigilancia%20o%20monitoreo%20activo/Reporte%20del%20monitoreo%20de%20trampas/2019/Junio/Mapas%20tiempo%20real%20del%2017\\_23\\_Jun\\_2019.pdf](http://sivicoff.cnf.gob.mx/ContenidoPublico/03%20Plagas%20bajo%20vigilancia%20o%20monitoreo%20activo/Reporte%20del%20monitoreo%20de%20trampas/2019/Junio/Mapas%20tiempo%20real%20del%2017_23_Jun_2019.pdf). Consultado en septiembre de 2022.
- SENASICA, 2020. Panorama internacional de los escarabajos ambrosiales invasivos (*Euwallacea* spp.)-Análisis Estratégico de Riesgos Sanitarios. 18 p. Citado en septiembre de 2022. Disponible en línea: [https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2020/octubre/Panoramainternacional\\_Euwallacea\\_30aaba8e-73ec-4460-a96b-4e613ca755ce.pdf](https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2020/octubre/Panoramainternacional_Euwallacea_30aaba8e-73ec-4460-a96b-4e613ca755ce.pdf). Consultado en septiembre de 2022.

- SENASICA. 2018. Décimo Segundo Informe Mensual Manejo Fitosanitario de los Ambrosiales. Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección de Protección Fitosanitaria. Disponible en línea: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/427458/Informe\\_No\\_12\\_Dicie\\_mbre\\_2018\\_Ambrosiales.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/427458/Informe_No_12_Dicie_mbre_2018_Ambrosiales.pdf). Consultado en septiembre de 2022.
- Shilev, S. 2013. Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. In N. K. Arora (Ed.), *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances* (pp. 147-167). New Delhi: Springer India.
- Smith, S.M., Beaver, R.A., Cognato, A.I., Hulcr, J., and Redford, A.J. 2019b. Southeast Asian Ambrosia Beetle ID. Disponible en línea: [http://idtools.org/id/wbb/sea-ambrosia/about\\_index.php](http://idtools.org/id/wbb/sea-ambrosia/about_index.php). Consultado en septiembre de 2022.
- Smith, S.M., Gomez, D.F., Beaver, R.A., Hulcr, J. and Cognato, A.I. 2019a. Reassessment of the species in the *Euwallacea fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) complex after the rediscovery of the “lost” type specimen. *Insects*. 10, 261.
- Soltani, A.A., Khavazi, K., Asadi-Rahmani, H., Omidvari, M., Dahaji, P. A. and Mirhoseyni, H. 2010. Plant growth promoting characteristics in some *Flavobacterium* spp. isolated from soils of Iran. *Journal of Agricultural Science*, 2(4): 10-115.
- Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H. and Varshney, R. 2016. Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rhizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(1): 85-95.
- Toumatia, O., Yekkour, A., Goudjal, Y., Riba, A., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N. and Zitouni, A. 2015. Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *Journal of Basic Microbiology*. 55(2): 221-228.
- Urvois, T., Auger-Rozenberg, M.A., Roques, A., Rossi, J.P. and Kerdelhue, C. 2021. Climate change impact on the potential geographical distribution of two invading *Xylosandrus ambrosia* beetles. *Scientific Reports*. 11:1339.

- Usha, R.J., Hema, S.N. and Kanchana, D.D. 2011. Antagonistic activity of actinomycetes isolates against human pathogen. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 1(2): 74-79.
- van den Berg, N., du Toit, M., Morgan, S.W., Fourie, G. and de Beer, Z.W. 2019. First Report of *Fusarium euwallaceae* causing necrotic lesions on *Persea americana* in South Africa. *The American Phytopathological Society (APS)*. 103(7): Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-18-1818-PDN>. Consultado en septiembre de 2022.
- Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., Van 't Westende, Y. A. M., Hartog, F. and Van Loon, L. C. 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10(6): 716-724.
- Viaene, T., Langendries, S., Beirinckx, S., Maes, M. and Goormachtig, S. 2016. *Streptomyces* as a plant's best friend? *FEMS Microbiology Ecology*. 92(8). fiw119.
- Wahyudi, A.T., Priyanto, J.A., Afrista, R., Kurniati, D., Astuti, R.I. and Akhdiya, A. 2019. Plant growth promoting activity of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 19: 1-8.
- Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moënne-Loccoz, Y., Bally, R. and Comte, G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*, 189(2): 494-506.
- Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of cultured Fungi and Key to Species, Third Edition. 426 p.
- Wisniewski, M. and Wilson, C.L. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*. 27, 94–98.
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El Ghaouth, A. and Stevens, C., 2007. Postharvest biocontrol: the discovery of new concepts and applications. In: Vincent, C., Goettal, M., Lazarovits, G. (Eds.), *Biological Control: International Case Studies*. CABI Publishing, UK 440 p. pp. 262–273.
- Yang, M., Lu, L., Pang, J., Hu, Y., Guo, Q., Li, Z., Wu, S., Lui, H. and Wang C. 2019. Biocontrol activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus*

TD-1 against *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Journal of Microbiology*. 57(5): 396-404.

Zhang, H., Kim, M.-S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S. and Paré, P.W. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*. 226(4): 839.