



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACTINOMICETOS MARINOS Y
QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Fusarium solani* EN
PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.).

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Juan Antonio Torres Rodríguez

La Paz, Baja California Sur, enero de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 21 horas del día 3 del Mes de diciembre del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ACTINOMICETOS MARINOS Y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Fusarium solani* EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) "

Presentada por el alumno:

Juan Antonio Torres Rodríguez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Co-Director de Tesis



Dr. Juan José Reyes Pérez
Co-Director de Tesis



Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Co-Tutora de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Tutor de Tesis



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Tutor de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 4 de diciembre de 2022.

Los miembros del comité de tesis del estudiante Juan Antonio Torres Rodríguez del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio: Ithenticate
- Filtros utilizados: Citas y referencias excluidas
- Porcentajes de similitud: Se muestra captura de pantalla

Tesis de grado		
INFORME DE ORIGINALIDAD		
10%		
ÍNDICE DE SIMILITUD		
FUENTES PRIMARIAS		
1	hdl.handle.net <small>Internet</small>	230 palabras — 1%
2	www.produccioncientificaluz.org <small>Internet</small>	165 palabras — 1%
3	repositorio.utc.edu.ec <small>Internet</small>	75 palabras — < 1%
4	bdigital.unal.edu.co <small>Internet</small>	66 palabras — < 1%
5	www.scielo.org.pe <small>Internet</small>	66 palabras — < 1%
6	patents.google.com <small>Internet</small>	63 palabras — < 1%
7	www.conafor.gob.mx:8080 <small>Internet</small>	56 palabras — < 1%
8	Carlos A. Rodríguez-Guzmán, Beatriz Montaña-Leyva, Rita M. Velázquez-Estrada, Jorge A. Sánchez-Burgos et al. "Estado actual de métodos alternativos, de control de hongos y su efecto en la calidad postcosecha de frutos de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)", TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2021 <small>Crossref</small>	43 palabras — < 1%

Firmas del comité



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Co-Director de Tesis



Dr. Juan José Reyes Pérez
Co-Director de Tesis



Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Co-Tutora de Tesis



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Tutor de Tesis



Dr. Luis Hernández Adame
Co-Tutor de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director Tesis

Dr. Juan José Reyes Pérez
Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador
Co-Director Tesis

Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Centro de Investigaciones y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
Co-Tutora de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Luis Hernández Adame
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Dr. Juan José Reyes Pérez
Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Luis Hernández Adame

Jurado de Examen

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Dr. Juan José Reyes Pérez
Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Luis Hernández Adame

Suplentes

Dra. Alejandra Nieto Garibay
Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Resumen

En los últimos años, el uso de microorganismos como agentes de biocontrol de fitopatógenos ha sido una alternativa a la aplicación de fungicidas sintéticos, los cuales, ocasionan daños a la salud humana, animal, al ambiente y generan resistencia en los fitopatógenos. Los actinomicetos aislados de suelo y plantas han disminuido las enfermedades ocasionadas por fitopatógenos, sin embargo, los microorganismos de ambientes marinos han mostrado una mayor capacidad antagónica. También, el quitosano es una alternativa para el control de los fitopatógenos, se ha demostrado que induce respuestas de defensa en las plantas y presenta actividad antifúngica. El tomate es un cultivo importante económicamente en muchos países y México es el principal exportador de este cultivo. Diversas especies de *Fusarium* ocasionan principalmente daño a las raíces del cultivo de tomate. Su control es con fungicidas sintéticos, sin embargo, la utilización de actinomicetos de origen marino y quitosano pueden ser una opción al uso de agroquímicos. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de actinomicetos marinos y quitosano para el control de *Fusarium solani* en plantas de tomate. *Fusarium* spp. se aisló de plantas enfermas y los actinomicetos se aislaron de sedimento marino de manglares y se identificaron a través de claves taxonómicas tradicionales y por técnicas moleculares. Se obtuvieron ocho aislados de *Fusarium* spp., determinando al aislado H8 como el más virulento y se identificó como *F. solani*. Se aislaron 30 actinomicetos, de los cuales solo cuatro inhibieron el crecimiento micelial de *F. solani*, la cepa A19 inhibió en más del 70% al fitopatógeno y fue identificada como *Streptomyces* sp. Solamente dos aislados inhibieron al fitopatógeno mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles, la cepa A19 presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con 76.75%. Los cuatro actinomicetos marinos (A20, A19, A18 y A15) y el actinomiceto de origen terrestre (ED48) produjeron sideróforos, sin embargo, presentaron diferencias en el halo de producción de sideróforos e inhibieron el crecimiento micelial de *F. solani*. El tratamiento con quitosano T3 (3 g L⁻¹) mostró el mayor PICR de *F. solani* con 81.43%. La combinación de actinomicetos y quitosano mejoraron las repuestas de defensa de las plantas de tomate a los daños ocasionados por *F. solani*. El tratamiento con actinomicetos marinos más quitosano (A19+Q) mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos en las variables de crecimiento (altura de la planta, diámetro del tallo, peso seco de la raíz y longitud de la raíz), severidad de la enfermedad (SE) e incidencia de la enfermedad (DI). Los actinomicetos (A19 marino) y (ED48 terrestre) y quitosano son potenciales agentes de biocontrol de *F. solani*.

Palabras claves: *Streptomyces*, sideróforos, compuestos volátiles, biocontrol, severidad enfermedad.

ORCID: 0000-0003-3326-4371

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel



Dr. Juan José Reyes Pérez

Summary

In recent years, the use of microorganisms as biocontrol agents for phytopathogens has been an alternative to the application of synthetic fungicides, which cause damage to human and animal health, the environment and generate resistance in phytopathogens. Actinomycetes isolated from soil and plants have reduced diseases caused by phytopathogens; however, microorganisms from marine environments have shown a greater antagonistic capacity. Also, chitosan is an alternative for controlling phytopathogens, it has been shown to induce defense responses in plants and has antifungal activity. Tomato is an economically important crop in many countries and Mexico is the leading exporter of this crop. Various species of *Fusarium* mainly cause damage to the roots of tomato crops. Its control is with synthetic fungicides; however, the use of actinomycetes of marine origin and chitosan can be an option to the use of agrochemicals. In this sense, the objective of this work was to evaluate the antifungal activity of marine actinomycetes and chitosan for the control of *Fusarium solani* in tomato plants. *Fusarium* spp. was isolated from diseased plants and actinomycetes from mangrove marine sediment and identified through traditional taxonomic keys and molecular techniques. Eight isolates of *Fusarium* spp. were obtained, determining isolate H8 as the most virulent and identified as *F. solani*. Thirty actinomycetes were isolated, of which only four inhibited the mycelial growth of *F. solani*. Strain A19 inhibited the phytopathogen by more than 70% and was identified as *Streptomyces* sp. Only two isolates inhibited the phytopathogen through the production of volatile organic compounds, A19 presented the highest percentage of radial growth inhibition (PICR) with 76.75%. The four marine actinomycetes (A20, A19, A18 and A15) and the terrestrial ED48 produced siderophores; however, they presented differences in the siderophore production halo and inhibited the mycelial growth of *F. solani*. The chitosan treatment (T3 g L⁻¹) showed the highest PICR of *F. solani* with 81.43%. The combination of actinomycetes and chitosan improved the defense responses of tomato plants to damage caused by *F. solani*. The marine actinomycete plus chitosan treatment (A19+Q) showed significant differences with the rest of the treatments in the growth variables (plant height, stem diameter, dry root weight, and root length), the severity of the disease (SE) and incidence of the disease (DI). Actinomycetes (marine A19) and (terrestrial ED48) and chitosan are potential biocontrol agents for *F. solani*.

Key words: *Streptomyces*, siderophores, volatile compounds, biocontrol, disease severity.

ORCID: 0000-0003-3326-4371

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel



Dr. Juan José Reyes Pérez

Dedicatoria

A mi madre María Isabel Rodríguez Yero que gracias a ella me he convertido en la persona que soy, aunque estemos separados, siempre me ha apoyado incondicionalmente, eres la persona más importante de mi vida, gracias mamá.

A mis hermanos, Juan Manuel y Gabriel José gracias por su apoyo en lo personal y en lo profesional, ustedes forman parte de estos resultados, los amo.

A mi abuela Cuca, que lamentablemente no pudo estar hasta el final, para compartir esta nueva etapa de mi vida, espero que donde te encuentres, te sientas bien, te quiero.

A mi abuela Maruca, siempre me apoyaste y consentiste, muchas gracias por hacer de mí una mejor persona, te quiero y siempre te extrañaré.

A mi papá, Juan Manuel Medel Riera sé que te hubiera gustado verme en esta nueva etapa de mi vida, muchas gracias por todo, te quiero, estos resultados te pertenecen también.

A mi novia, Guadalupe Cornejo has sido mi apoyo en un país ajeno, tanto en lo personal, como en lo profesional, gracias a ti esta etapa ha sido menos difícil, te amo.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (2021910046). Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) por permitirme cursar un posgrado de excelencia, en especial al personal administrativo y de Posgrado.

A mi Co-Director de Tesis el Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel, gracias por su formación, por tratar que sea un mejor profesional y por tenerme mucha paciencia, muchas gracias.

A mi Co-Director de Tesis el Dr. Juan José Reyes Pérez, gracias por permitir que pudiera venir a otro país a superarme profesionalmente, gracias por todo el apoyo que siempre me has brindado en lo profesional y en lo personal, muchas gracias.

A la Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes por contribuir a la realización de mis experimentos, por sus consejos y siempre apoyarme en mi formación, muchas gracias doctora.

A la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar por siempre estar dispuesta a contribuir en la realización de mis experimentos, en mi formación y en aportar sus conocimientos y experiencias, muchas gracias.

Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez por formar parte de mi comité tutorial, siempre apoyarme en la realización de estos experimentos, por sus consejos sobre mi formación y por compartir sus conocimientos, muchas gracias.

Al Dr. Luis Hernández Adame por aceptar formar parte de mi comité en un momento tan importante, siempre estar dispuesto a contribuir con mi formación, muchas gracias.

Al M.C Jorge Alejandro, gracias por tu apoyo en todo momento, por compartir tus conocimientos, muchas gracias.

Al M.C Liliana Riera por su apoyo incondicional, en los momentos que más necesité, muchas gracias.

Al M.C Manuel Moreno Legorreta, muchas gracias por el apoyo brindado incondicional, siempre estaré agradecido.

Al M.C Martin Aguilar García, muchas gracias por todo el apoyo brindado en el laboratorio de Fitopatología y su apoyo incondicional en todo momento.

A la M.C María Sofía Ramos Galván siempre recibí un gran apoyo tanto en lo profesional, como en lo personal de su parte, muchas gracias.

A la Dr. Norma Angélica Ochoa Álvarez muchas gracias por su apoyo en la realización de los experimentos, y por compartir sus conocimientos.

Al M.C Ariel Arturo Cruz Villacorta, responsable del Laboratorio de Microscopia Electrónica por compartir su experiencia en procedimientos para la Microscopia Electrónica de Barrido.

Al M. C José Manuel Melero Astorga por sus consejos, su amistad, gracias por apoyarme en mis experimentos.

A la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por su apoyo en todos los procesos, en especial a la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, a la Lic. Osvelia Ibarra Morales, a Tania Verónica Núñez Valdez y al Ing. Horacio Sandoval Gómez.

A mis compañeros del laboratorio, sin ustedes no se hubieran podido lograr estos resultados, a todos, muchas gracias.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Principales características e importancia económica del cultivo del tomate	3
2.2 Generalidades de <i>Fusarium spp.</i>	3
2.2.1 Ciclo de vida de <i>Fusarium spp.</i>	4
2.3 Principales efectos ocasionados por los fungicidas	5
2.4 Importancia del estudio del ecosistema de Manglar	6
2.5 Características generales de los actinomicetos	7
2.6 Actinomicetos como agentes de biocontrol	8
2.7 Principales mecanismos antagonico de los actinomicetos	8
2.7.1 Producción de antibióticos	9
2.7.2 Competencia por espacio y nutrimentos	9
2.7.3 Producción de sideróforos	10
2.7.4 Producción de enzimas líticas	11
2.7.5 Compuestos orgánicos volátiles (COVs)	12
2.7.6 Inducción de resistencia	13
2.8 Principales características del quitosano	15
2.8.1 Propiedades antimicrobianas del quitosano	17
2.8.2 Efecto del quitosano en los hongos fitopatógenos	18
2.8.3 Reconocimiento molecular del quitosano	19
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo general	23
5.2 Objetivos específicos	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de <i>Fusarium spp.</i>	24
6.1.1 Aislamiento	24
6.1.2 Identificación morfológica	25
6.1.3 Pruebas de patogenicidad	25
6.1.4 Micrografías	26
6.1.5 Identificación molecular	26
6.1.6 Análisis filogenético	27
6.2 Aislamiento e identificación de actinomicetos marinos	27
6.2.1 Recolección de muestra de suelo de mangle	27
6.2.2 Aislamiento de actinomicetos de sedimentos de manglar	28
6.2.3 Identificación morfológica de los actinomicetos	29

6.3 Antagonismo <i>in vitro</i> de actinomicetos marinos vs <i>F. solani</i>	29
6.4 Identificación molecular.....	30
6.4.1 Análisis filogenético.....	30
6.5 Producción de sideróforos por actinomicetos marinos.....	31
6.5.1 Efecto del hierro sobre la actividad antifúngica de <i>F. solani</i>	31
6.6 Producción de compuestos orgánicos volátiles por actinomicetos marinos.....	32
6.7 Efecto antifúngico <i>in vitro</i> del quitosano hacia <i>F. solani</i>	32
6.7.1 Efecto antifúngico del quitosano en la germinación de esporas.....	32
6.7.2 Efecto de quitosano en la ultraestructura celular de <i>F. solani</i>	33
6.8 Biocontrol de actinomicetos y quitosano hacia <i>F. solani</i> en tomate.....	33
6.8.1 Inóculo de actinomicetos, <i>F. solani</i> y concentración del quitosano.....	33
6.8.2 Tratamientos y condiciones de crecimiento.....	33
6.8.3 Evaluación de la severidad de la enfermedad.....	34
6.9 Análisis Estadístico.....	35
7. RESULTADOS	36
7.1 Aislamiento e identificación de especies de <i>Fusarium</i> spp.....	36
7.1.1 Características morfológicas macroscópicas.....	36
7.1.2 Características microscópicas.....	37
7.1.3 Patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp.....	39
7.1.4 Identificación molecular y análisis filogenético.....	41
7.2 Aislamiento e identificación morfológica de actinomicetos marinos.....	42
7.3 Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> de actinomicetos frente a <i>F. solani</i>	46
7.4 Identificación molecular y análisis filogenético.....	47
7.5 Producción de sideróforos.....	48
7.6 Producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs).....	50
7.7 Efecto antifúngico <i>in vitro</i> del quitosano hacia <i>F. solani</i>	50
7.8 Biocontrol de actinomicetos y quitosano hacia <i>F. solani</i> en plantas de tomate.....	53
8. DISCUSIÓN	56
8.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp.....	56
8.2 Aislamiento e identificación de actinomicetos de sedimentos de manglar.....	57
8.3 Mecanismos de acción de actinomicetos marinos.....	58
8.4 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de quitosano hacia <i>F. solani</i>	61
8.5 Biocontrol de actinomicetos marinos y quitosano hacia <i>F. solani</i> en tomate.....	62
9. CONCLUSIONES	66
10. LITERATURA CITADA	67
11. ANEXOS	84

Lista de figuras

Figura 1. Distribución de las áreas de manglar en México.	6
Figura 2. Competencia por espacio y nutrimentos entre actinomicetos y hongos fitopatógenos. Elaboración propia mediante Biorender.com.....	10
Figura 3. Producción de sideróforos por actinomicetos. Elaboración propia mediante Biorender.com.....	10
Figura 4. Representación de la producción de enzimas líticas por actinomicetos y su efecto en hongos fitopatógenos. Elaboración propia mediante Biorender.com.	12
Figura 5. Producción compuestos volátiles por actinomicetos y su efecto en hongos fitopatógenos. Elaboración propia mediante Biorender.com.	13
Figura 6. Actividad antimicrobiana del quitosano en las células. Tomado de Torres-Rodriguez et al., 2021.....	18
Figura 7. Toma de muestras A: Plantas de tomate que presentan síntomas de fusariosis; B: Toma de muestras de raíces; C: Síntomas de marchitez y amarillamiento; D: Raíces plantas infestadas.	24
Figura 8. Área de estudio de la finca El Carrizal.....	25
Figura 9. Área de muestreo en zonas de manglar de La Paz, Baja California Sur.....	28
Figura 10. Características morfológicas de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp., aislados de plantas sintomáticas de tomate, cultivados en medio de cultivo PDA a los 6 días a 28 °C (Aislados: H 1-8; A: Anverso, B: Reverso).	36
Figura 11. Características microscópicas de los aislados de <i>Fusarium</i> spp., procedentes de tomate en CLA (Aislados: 1-8, H: Hifas, M: Macroconidios, MC: Microconidios, C: Clamidiosporas).....	38
Figura 12. Estructuras del aislado H8 de <i>Fusarium</i> spp. presentes en los sistemas vasculares de las plantas de tomate. MC: Macroconidio; MI: Microconidio; M: Micelio; C: Clamidiosporas.....	41
Figura 13. Árbol filogenético basado en la región ITS1-5.8s-ITS2 del hongo H8 aislado de plantas de tomate enfermas por <i>Fusarium</i> spp. Los valores de bootstrap se indican como porcentajes sobre los nodos en este análisis (10,000 bootstrap). El número de acceso a GenBank se encuentra después de los nombres de cada especie.	42
Figura 14. Características morfológicas de los actinomicetos aislados de zonas de manglar.	43
Figura 15. Antagonismo in vitro de actinomicetos marinos contra <i>F. solani</i> . (a) Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de actinomicetos contra <i>F. solani</i> . (b) PICR de sobrenadantes de actinomicetos contra <i>F. solani</i> . Letras iguales en las columnas no difieren significativamente según Fisher ($P < 0,05$).	47
Figura 16. Árbol filogenético basado en el gen 16S ARNr de los actinomicetos A20, A19, A18 y A15 aislados de ambientes marinos. Los valores de bootstrap se indican como porcentajes sobre los nodos en este análisis (10,000 bootstrap). El número de acceso a GenBank se encuentra después de los nombres de cada especie.	48
Figura 17. Porcentaje de inhibición de COVs de actinomicetos hacia <i>F. solani</i> . Las barras es la media de cinco repeticiones \pm Desviación estándar. Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.....	50
Figura 18. (a) Porcentaje de inhibición micelial de quitosano hacia <i>F. solani</i> . (b) Porcentaje de inhibición de biomasa de quitosano hacia <i>F. solani</i> . Las barras es la media de cinco repeticiones \pm Desviación estándar. Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.	51

- Figura 19.** Efecto de quitosano en la ultraestructura celular de *F. solani*. a: micelio de *F. solani*; b: esporas *F. solani*. (microscopia electrónica de barrido).52
- Figura 20.** Severidad de la enfermedad (SE) ocasionada por *F. solani* en plantas de tomate tratadas con actinomicetos y quitosano. Las barras es la media de seis repeticiones \pm Desviación estándar. Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher...54
- Figura 21.** Incidencia de la enfermedad ocasionada por *F. solani* en plantas de tomate tratadas con actinomicetos y quitosano. Las barras es la media de seis repeticiones. Las columnas con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de comparaciones múltiples para proporciones de Dunn ($p < 0.05$).55

Lista de tablas

Tabla 1. Actinomicetos como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos.....	8
Tabla 2. Principales fuentes de obtención de la quitina.....	16
Tabla 3. Características morfológicas de las colonias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de raíces de tomate.....	37
Tabla 4. Características de las estructuras de reproducción de los aislados de <i>Fusarium</i> spp.	39
Tabla 5. Severidad de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. y su efecto en variables de crecimiento en tomate.....	40
Tabla 6. Características morfológicas de los aislados obtenidos de sedimentos de mangles.	44
Tabla 7. Cantidad de aislados obtenidos de cuatro estaciones de manglares de La Paz, Baja California Sur en diferentes medios de cultivos.	46
Tabla 8. Producción de sideróforos por actinomicetos marinos.....	49
Tabla 9. Inhibición crecimiento radial de <i>F. solani</i> por sideróforos.....	49
Tabla 10. Biocontrol de actinomicetos y quitosano hacia los daños ocasionados por <i>F. solani</i> en plantas de tomate.	53

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es un cultivo importante en muchas regiones del mundo (Campos *et al.*, 2022). China es el principal país productor de este cultivo y México el principal exportador en el mundo (FIRA, 2019). Este cultivo es sensible a la enfermedad del marchitamiento vascular ocasionada por *Fusarium* spp. (Li *et al.*, 2023), la cual, ocasiona pérdidas cercanas al 80% de la producción (Akbar *et al.*, 2016). Los síntomas ocasionados por *Fusarium* spp. son: defoliación, marchitamiento y amarillamiento de hojas, necrosis del tallo y raíz (Summerell *et al.*, 2003). Este fitopatógeno está adaptado a sobrevivir en el suelo en ausencia de una planta huésped, haciendo difícil su control (Cruz *et al.*, 2018).

En la actualidad, la aplicación de fungicidas sintéticos son el principal método de control para *Fusarium* spp. (Ismaila *et al.*, 2022). Sin embargo, el uso continuo de los fungicidas sintéticos ocasiona resistencia en los fitopatógenos y efectos negativos al medio ambiente, la salud humana y animal (Meena *et al.*, 2020b; Torres-Rodriguez *et al.*, 2021; Cech *et al.*, 2023). En Estados Unidos de América y Europa, algunos fungicidas sintéticos, como Benomilo, Tridemorf y Maneb, han sido prohibidos debido a sus efectos adversos (van Lenteren *et al.*, 2018). Por lo tanto, la búsqueda de alternativas para disminuir la aplicación de fungicidas sintéticos es una prioridad en el mundo (Maluin y Hussein, 2020, Torres-Rodriguez *et al.*, 2022).

La investigación de los agentes de biocontrol ha evolucionado para integrarse más en un enfoque de sistemas de producción con una mayor conciencia del medio ambiente. El control biológico ofrece ventajas sobre los productos químicos sintéticos en el control de enfermedades de las plantas, los agentes de biocontrol generalmente se enfocan en un grupo específico de patógenos, por lo tanto, presentan menos impactos negativos en el ecosistema en comparación con los fungicidas sintéticos (He *et al.*, 2021). Además, son de bajo costo, no provocan contaminación del suelo, agua, no presentan problemas de gestión de residuos, entre otros (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019).

En los últimos años, el uso de actinomicetos como agentes de biocontrol de fitopatógenos ha sido una alternativa a la aplicación de fungicidas sintéticos (Boukaew *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023). Los principales mecanismos antagónicos de los actinomicetos son la competencia por

espacio y nutrientes (Fadhilah *et al.*, 2021), la producción de antibióticos (Xia *et al.*, 2022), sideróforos (Meena *et al.*, 2022), enzimas líticas (Gebily *et al.*, 2021), compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Gong *et al.*, 2022) y la inducción de resistencia del hospedero (Kaari *et al.*, 2022).

Los actinomicetos de ambientes terrestres han sido ampliamente estudiados, sin embargo, los actinomicetos de ambientes marinos son un recurso poco analizado, que pueden ser más eficientes en el control de los fitopatógenos (Ameen *et al.*, 2021; Torres-Rodriguez *et al.*, 2022). Los manglares son ecosistemas que se encuentran en las regiones intermareales tropicales y subtropicales (Das *et al.*, 2022). En estos ecosistemas, factores como la salinidad y la disponibilidad de nutrientes son muy escasos, lo que resulta en características únicas para el aislamiento de actinomicetos marinos (Soldan *et al.*, 2019).

Otra alternativa para controlar a los fitopatógenos es el quitosano (Deshaies *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023). El quitosano es extraído de la quitina presente en el exoesqueleto de los crustáceos (Qiu *et al.*, 2022), pared celular de hongos (Mohan *et al.*, 2022), cutícula de insectos (Hahn *et al.*, 2022), entre otros. Este biopolímero presenta propiedades biocompatibles, biodegradables y biofuncionales (Torres-Rodriguez *et al.*, 2021).

En la agricultura, el quitosano ha sido utilizado para inducir la resistencia en las plantas (González-Peña Fundora *et al.*, 2022), para aumentar la capacidad antagonista de microorganismos benéficos (El Amerany *et al.*, 2020) y para incrementar la productividad de los cultivos (Palacios-Torres *et al.*, 2022). Además, el quitosano induce cambios morfológicos y alteraciones estructurales en las células fúngicas que causan la muerte celular (Ke *et al.*, 2022). Mejora las defensas de las plantas, induce la producción de especies reactivas de oxígeno (Silva *et al.*, 2018), enzimas líticas (Obianom *et al.*, 2019), proteínas (PR) relacionadas con la patogénesis (Liu *et al.*, 2019), fitoalexinas (Gai *et al.*, 2019), promueve la lignificación (Jiang *et al.*, 2018) e induce la formación de callosa (de Lamo *et al.*, 2020).

El uso de actinomicetos aislados de zonas de manglar de La Paz, Baja California Sur, México y quitosano permitiría reducir las aplicaciones de fungicidas sintéticos en el cultivo de tomate, disminuyendo los efectos negativos a la salud humana, animal y al medio ambiente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Principales características e importancia económica del cultivo del tomate

El tomate es uno de los cultivos de mayor valor económico en la actualidad, su demanda aumenta continuamente y con ella, su producción y comercio (FAO, 2018). Presenta un valor anual que supera los 90 mil millones de dólares (FAOSTAT, 2019). Además, es una hortaliza que interviene en la elaboración de muchos productos de la industria como puré, encurtidos y jugos (Bergougnoux, 2014).

El tomate es una planta perenne, de porte arbustivo y presenta dos tipos de crecimiento; determinado e indeterminado (Acquaah, 2008). Sus tallos son gruesos y angulosos, el sistema radicular está compuesto por una raíz principal corta y numerosas raíces secundarias (Escobar y Lee, 2009). Las hojas son compuestas, anchas y aplanadas, con folíolos peciolados y lobulados, con el borde dentado. Las flores son hermafroditas, regulares e hipóginas. El fruto del tomate es una baya, que se une a la planta por un pedicelo con un engrosamiento articulado (Chamarro, 1995). Además de su valor comercial y nutricional, sus características fisiológicas, como su ciclo de vida corto y su genoma relativamente pequeño, le han convertido en una de las especies más estudiadas en áreas de la genómica y genética, convirtiéndose en un excelente modelo para los trabajos de investigación (Carvalho *et al.*, 2011).

El tomate se cultiva aproximadamente en 5 millones de hectáreas alrededor del mundo. Asia domina el mercado, con prácticamente un 60% de la producción, seguido por América, Europa, África y por último Oceanía, con apenas un 0.15%. China es el principal productor con 32.6% y México ocupa la novena posición con 2.3% (FIRA, 2019). Sin embargo, México es el principal exportador de tomate con 24% (SAGARPA, 2018). En México, la producción de tomate creció a una tasa promedio anual de 3.6% entre 2007 y 2017 (FIRA, 2019).

2.2 Generalidades de *Fusarium spp.*

Entre los principales hongos filamentosos, se encuentra el género de *Fusarium*, perteneciente al *Phylum Ascomycota*, Clase *Sordariomycetes*, Orden *Hypocreales* de la Familia *Nectriaceae*, descrito por primera vez en 1809 por Link (Leslie y Summerell, 2008). Este hongo presenta una

agrupación polifilética compleja. A principios de la década de 1900 se describían alrededor de 1000 especies, sin embargo, entre 1950 y 1960 sólo nueve, finalmente se describen entre 100 y 500 especies de *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2008).

En los ecosistemas agrícolas, los fitopatógenos del suelo (*Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp.) son una limitación importante en la producción y calidad de los alimentos. Además, están adaptados a sobrevivir en el suelo en ausencia de una planta huésped, haciendo complejo su manejo y control (Cruz *et al.*, 2018). Causan una amplia gama de enfermedades en las plantas, las más importantes son la pudrición de la corona y la raíz, la pudrición del tallo, el tizón de la cabeza y el grano, y las enfermedades de marchitez vascular (Summerell *et al.*, 2003).

Entre las condiciones climáticas de importancia para el desarrollo de las especies de *Fusarium* se encuentran, altas temperaturas en el rango de los 20-25 °C, alta intensidad lumínica y elevada humedad relativa del ambiente (75-95%) (Summerell *et al.*, 2003). Este fitopatógeno se encuentra distribuido en casi todos los suelos, su diversidad puede variar, dependiendo de varios factores, como el huésped, las propiedades físico-químicas del suelo, las condiciones climáticas, especialmente la humedad y las actividades humanas (Summerell *et al.*, 2010). Los métodos de control utilizados para el manejo de este fitopatógeno son, principalmente, medidas preventivas como: el uso de cultivares resistentes, uso de fungicidas sintéticos y control biológico (Mahmood *et al.*, 2015).

2.2.1 Ciclo de vida de *Fusarium* spp.

Fusarium spp. está presente en el suelo como saprofito, sobre restos vegetales en descomposición o como estructura de resistencia (macroconidios, microconidios y clamidospora) (Summerell *et al.*, 2003). Al establecerse un cultivo y si las condiciones ambientales son favorables para el hongo, prolifera y causa daños de carácter irreversible para las plantas (Backhouse, 2014).

La progresión de la infección vascular de la planta por *Fusarium* spp. comienza con el reconocimiento de la raíz a través de señales del huésped-patógeno, colonización del tejido vascular y finalmente exudan toxinas y factores de virulencia, casi siempre provocando la muerte de las plantas (Di *et al.*, 2016). *Fusarium* spp. ingresa a la planta mediante aperturas

naturales o heridas, luego se propaga a través del tejido vascular y habita en los vasos del xilema de la planta, lo que resulta en la obstrucción de los vasos por la producción de micelio (Singh *et al.*, 2017). Para no permitir el avance del fitopatógeno, como respuesta, la planta libera polisacáridos (gomas-tilosas) que taponean los haces vasculares (Summerell *et al.*, 2003). Este fitopatógeno presenta la capacidad de dispersarse a otras áreas, ya que permanece en los restos de los tejidos vegetales como espora, micelio o clamidospora. Estos se dispersan a través del viento, por los propágulos o semillas infectadas, al llover o emplear la maquinaria o implementos agrícolas en otras zonas (Summerell *et al.*, 2010).

2.3 Principales efectos ocasionados por los fungicidas

Los daños ocasionados por los fitopatógenos son los principales problemas para alcanzar altos rendimientos en las producciones agrícolas y poder satisfacer las necesidades alimenticias de la población (Grandini *et al.*, 2022). En la actualidad los fungicidas sintéticos desempeñan un papel importante para el control de estos fitopatógenos (Meena *et al.*, 2020b).

Los fungicidas sintéticos no sólo se limitan a controlar los fitopatógenos, una vez que están en contacto con los suelos agrícolas, provocan un desequilibrio en la comunidad microbiana de la rizosfera del suelo (Schnug *et al.*, 2015; Fang *et al.*, 2016). También, los humanos y la fauna silvestre han presentado problemas de salud por la exposición a fungicidas sintéticos (Li *et al.*, 2022) que provocan resistencia en los fitopatógenos, contaminación y una degradación ambiental (Wang *et al.*, 2022). La resistencia a los fungicidas está asociada con mutaciones puntuales en el codón 198 o 200 en el gen de la β -tubulina (Bradshaw *et al.*, 2021). Cech *et al.*, 2023 demostraron en un estudio de seis años, que los residuos de productos químicos sintéticos con propiedades peligrosas para los seres humanos aumentaron significativamente a lo largo de los años con respecto a la toxicidad para la reproducción (del 21 % de las sustancias detectadas en 2014 al 88 % en 2020) (Cech *et al.*, 2023).

En México, en los últimos 10 años la demanda de fungicidas sintéticos y bactericidas incrementó un 528%, aumentando 437% lo aplicable en tierra arable y cultivos permanentes; en el sector agropecuario el apoyo con créditos por parte del gobierno incrementó un 268% (FAOSTAT, 2019). Debido a los efectos negativos que causan estos fungicidas sintéticos se están eliminando

importante de materia orgánica terrestre para los océanos (Fikri *et al.*, 2022). También, representan refugios de vida silvestre tanto para animales marinos como terrestres, son áreas de anidación y alimentación de muchas especies de aves costeras y sus raíces sirven de sustrato para especies de moluscos utilizadas comercialmente (Quitain *et al.*, 2022). Los manglares son ecosistemas que albergan diversos grupos de microorganismos, incluidos actinomicetos, bacterias, hongos, cianobacterias, microalgas, macroalgas y protozoos similares a hongos (Palit *et al.*, 2022).

2.5 Características generales de los actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias Gram-positivas cosmopolitas, se encuentran distribuidos en una gran variedad de hábitats terrestres y marinos (Shrestha *et al.*, 2021). Además, juegan un papel ecológico importante en el ciclo de los nutrientes del suelo (AbdElgawad *et al.*, 2020). Se caracterizan por un alto contenido de GC (guanina y citosina) en su material genético (AbdElgawad *et al.*, 2020). Los actinomicetos forman micelios vegetativos o aéreos y son capaces de reproducirse por fisión binaria (van Bergeijk *et al.*, 2020). Producen esporas debido al agotamiento de los nutrientes, permitiéndoles permanecer en estado latente por un largo tiempo hasta encontrar las condiciones favorables para su crecimiento (Mitra *et al.*, 2022). Su pared celular es una estructura rígida, formada por algunos compuestos complejos como peptidoglicano, ácido teicoico, teichurónico y polisacáridos (Goodfellow *et al.*, 1998). En determinada etapa los actinomicetos fueron catalogados como miembros del grupo de los hongos filamentosos, al reunir características similares a ellos como la similitud en su forma de crecer y desarrollarse y la formación de un filamento denominado hifas con extensas ramificaciones (micelio) (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2016). Estos microorganismos son importantes en la industria farmacéutica por poseer metabolitos secundarios bioactivos que se emplean en la producción de compuestos para la protección de la salud humana como la estreptomicina, rifampicina, tetraciclina, agentes anti-cancerígenos, antifúngicos e inmunosupresores (Sharma *et al.*, 2019).

2.6 Actinomicetos como agentes de biocontrol

La importancia de los actinomicetos como agentes de biocontrol se debe a sus características positivas inherentes. No causan daño a la salud humana, no son tóxicos a las plantas, mejoran el rendimiento vegetal y su aplicación ha reducido el uso de productos sintéticos (Li *et al.*, 2021a; Zhou *et al.*, 2022). Entre los diferentes géneros, *Streptomyces* se ha investigado ampliamente, ya que es fácil de aislar (Zou *et al.*, 2021). En la actualidad se han estudiados diversos actinomicetos como agentes de biocontrol hacia los fitopatógenos y sus mecanismos de acción (Tabla 1).

Tabla 1. Actinomicetos como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos.

Actinomicetos	Fitopatógeno	Cultivo	Inhibición <i>in vivo</i>	Mecanismo antagonista	Referencia
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Colletotrichum fragariae</i>	Fresa	100%	Metabolitos secundarios	Li <i>et al.</i> , 2021a
<i>Streptomyces sampsonii</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Judías verdes	100%	Metabolitos secundarios	Gebily <i>et al.</i> , 2021
<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomate	97%	Inducción de resistencia	Kaari <i>et al.</i> , 2022
<i>S. sichuanensis</i>	<i>F. oxysporum</i>	Platano	51%	Sideróforos	Qi <i>et al.</i> , 2022
<i>S. rameus</i>	<i>Rhizoctonia bataticola</i>	Frijol	70%	Enzimas líticas, sideróforos	Meena <i>et al.</i> , 2022
<i>Amycolatopsis sp.</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Maíz	79%	Enzimas líticas	Cabrera <i>et al.</i> , 2020
<i>Arthrobacter humicola</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Tomate	31%	Metabolitos secundarios	Ramlawi <i>et al.</i> , 2021
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Trigo	72%	Enzimas líticas, sideróforos	Allali <i>et al.</i> , 2019

2.7 Principales mecanismos antagónico de los actinomicetos

El control biológico se aplica en más de 30 millones de hectáreas en todo el mundo. Europa es el mercado comercial más grande y existe un fuerte crecimiento en el uso de agentes de biocontrol, particularmente de agentes microbianos en América Latina, seguida de Asia (van Lenteren *et al.*, 2018). Los agentes de biocontrol utilizan una combinación de varios mecanismos antagónicos de acción para controlar hongos fitopatógenos (Lahlali *et al.*, 2022). Los principales mecanismos antagonistas de los actinomicetos son: competencia por espacio y

nutrimentos, producción de antibióticos, producción de sideróforos, producción de enzimas líticas, producción de compuestos volátiles (COVs) y la inducción de resistencia, entre otros (Alblooshi *et al.*, 2022; Kaari *et al.*, 2022). Es indispensable el conocimiento de los mecanismos de acción de los agentes de biocontrol, para mejorar su viabilidad y aumentar su potencial (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019).

2.7.1 Producción de antibióticos

Los actinomicetos producen metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos (Alblooshi *et al.*, 2022). Dado que las condiciones de ambientes marinos son considerablemente diferentes de las terrestres, los actinomicetos marinos se consideran nuevas fuentes de obtención de compuestos bioactivos (Ameen *et al.*, 2021). Aproximadamente el 80% de los antibióticos conocidos son producidos por actinomicetos (estreptomicina, espectinomicina, neomicina, tetraciclina, eritromicina y nistatina, entre otros). Además, se han descubierto muchos metabolitos con propiedades antimicrobianas frente a hongos fitopatógenos como la anfotericina B, los macrólidos, la actinomicina D, la natamicina, la antimicina y la neopeptina., entre otros (Zhang *et al.*, 2020).

2.7.2 Competencia por espacio y nutrimentos

La competencia es un mecanismo indirecto que permite que los actinomicetos desplacen a los fitopatógenos en la colonización del hospedero (Fig. 2) (Fadhilah *et al.*, 2021). La competencia se inicia cuando dos o más microorganismos requieren de la misma fuente de carbono, como carbohidratos (sacarosa, glucosa, maltosa y fructosa) o espacio, para su crecimiento (Fadiji *et al.*, 2020). También, el hierro es uno de los recursos que puede limitar el crecimiento de los fitopatógenos y es una fuente bien conocida de competencia de nutrientes en la rizosfera (González-Franco y Robles-Hernández, 2009). La plasticidad ecológica y el rápido crecimiento de los microorganismos antagonistas les permite asimilar los nutrientes disponibles en el huésped en mayor cantidad que los hongos fitopatógenos, reduciendo así la etapa de germinación de esporas y los procesos de infección al huésped (Latz *et al.*, 2018; Köhl *et al.*, 2019). La competencia es un mecanismo efectivo de biocontrol cuando el antagonista se encuentra

presente en cantidades suficientes y asimila los nutrientes con mayor rapidez y en mayor cantidad que los fitopatógenos (Lahlali *et al.*, 2022).

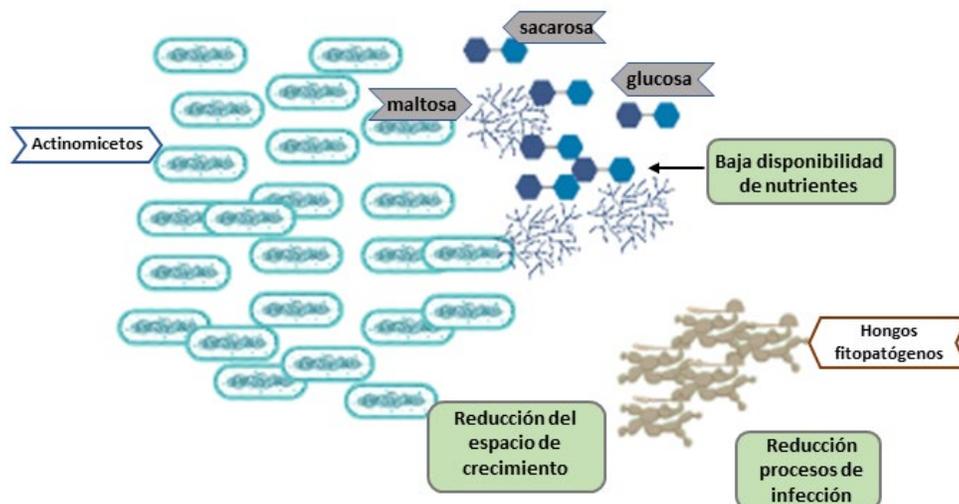


Figura 2. Competencia por espacio y nutrientes entre actinomicetos y hongos fitopatógenos. Elaboración propia mediante Biorender.com.

2.7.3 Producción de sideróforos

Los sideróforos son moléculas de secuestro de hierro de bajo peso molecular (500-1000 Da) que se unen con iones Fe^{3+} para ser transportados a la célula y son secretadas en respuesta a una baja disponibilidad de Fe^{3+} (Fig. 3) (Ghosh *et al.*, 2020).

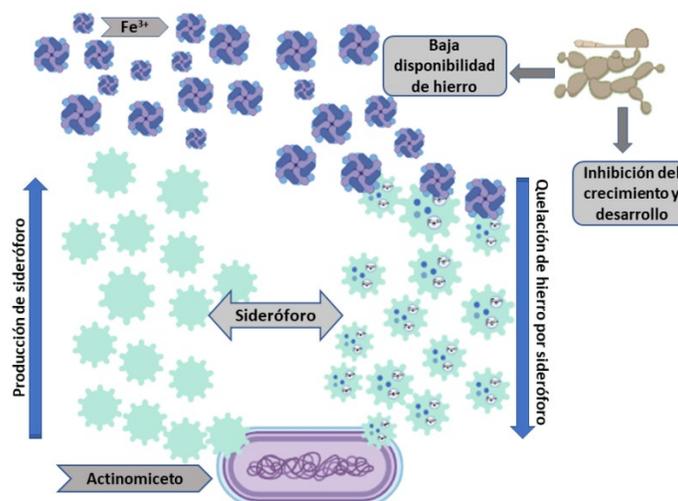


Figura 3. Producción de sideróforos por actinomicetos. Elaboración propia mediante Biorender.com.

Los sideróforos se pueden clasificar en tres clases: catecolato, hidroxamato, carboxilato y algunos sideróforos tienen una mezcla de grupos, es decir, catecolato-hidroxamato mixto (Roskova *et al.*, 2022). Los sideróforos forman principalmente complejos octaédricos hexadentados con hierro (III) preferentemente y su química de coordinación se rige por el principio HSAB (ácidos y bases duros y blandos) (Butler y Theisen, 2010). Una producción de sideróforos en cantidades suficientes, por los agentes de biocontrol limita la disponibilidad de Fe^{3+} para el fitopatógeno, limitando el crecimiento de los fitopatógenos y su virulencia, debido a que los microorganismos sin hierro en el medio no pueden realizar procesos biológicos vitales como la síntesis y reparación de ácidos nucleicos, respiración, transporte fotosintético, reducción de nitratos o desintoxicación de radicales libres (Hernandez-Montiel *et al.*, 2018). Se ha demostrado la producción de sideróforos por cepas de *Streptomyces*, las cuales producen sideróforos de tipo hidroxamato conocido como desferrioxamina (Yamanaka *et al.*, 2005). También, producen enterobactina de tipo catecolato (Lee *et al.*, 2012). Mientras que nuevos sideróforos de heterobactina tipo mixto catecolato-hidroxamato se han encontrado en cepas de *Rhodococcus* spp. (Hong *et al.*, 2016).

2.7.4 Producción de enzimas líticas

Los actinomicetos producen enzimas líticas como; quitinasa, β -1,3-glucanasa y proteasa, que degradan la pared celular de los fitopatógenos ocasionando la pérdida de la integridad de la pared y la membrana, liberando el material intracelular y provocando la muerte celular (Benhadj *et al.*, 2019) (Fig. 4). La pared celular en los hongos es una capa resistente y rígida, responsable de la integridad física, formada por capas de quitina, β -1,3-glucano y proteínas (Spadaro y Droby, 2016). Las enzimas β -1,3 glucanasa hidroliza las uniones β -D-glicosídicas de β -1,3 glucano y las quitinasas hidrolizan las uniones β -1,4 de Nacetil- β -D-glicosamida de quitina, rompiendo las paredes celulares de los fitopatógenos. Las proteasas, hidrolizan a las proteínas, específicamente las manoproteínas que componen la pared celular de los fitopatógenos (Kaur *et al.*, 2005; Carmona-Hernandez *et al.*, 2019).

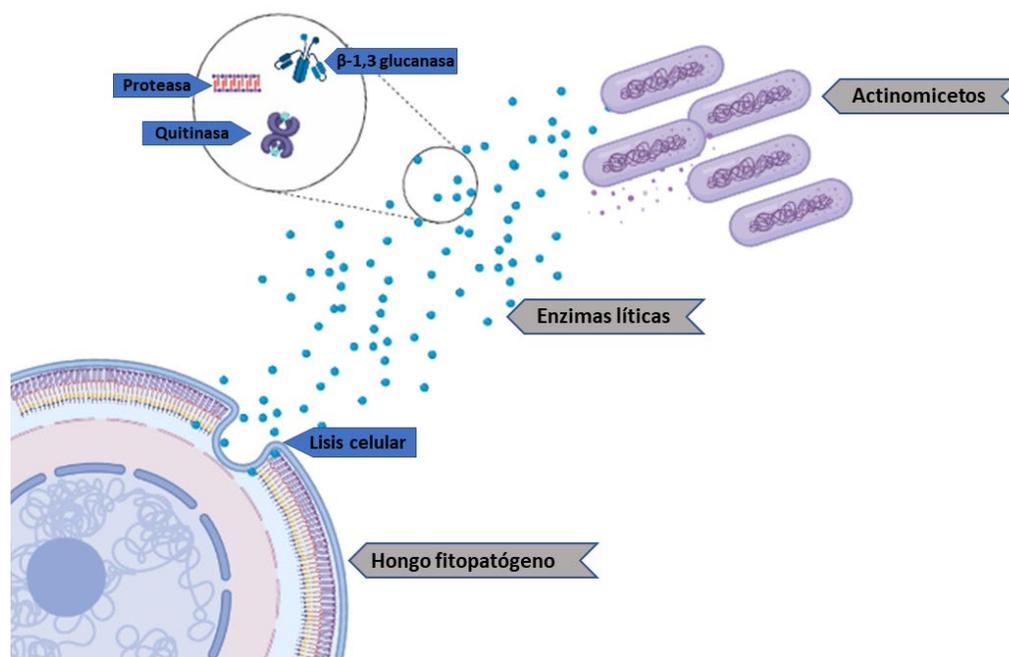


Figura 4. Representación de la producción de enzimas líticas por actinomicetos y su efecto en hongos fitopatógenos. Elaboración propia mediante Biorender.com.

2.7.5 Compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) son compuestos de bajo peso molecular que se evaporan fácilmente a temperatura y presión normales, lo que les otorga la capacidad de difundirse a través de la atmósfera y el suelo (del Rosario Cappellari *et al.*, 2019). La mayoría son solubles en lípidos y por lo tanto tienen baja solubilidad en agua. Los COVs viajan grandes distancias en ambientes estructuralmente heterogéneos, así como en compuestos sólidos, líquidos o gaseosos (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019). Los COVs producidos por los actinomicetos inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, promueven el crecimiento de las plantas, tienen actividad nematicida e inducen resistencia sistémica en las plantas (Fig. 5) (Gebily *et al.*, 2021; Gong *et al.*, 2022). Los COVs inhiben el micelio, causando hinchazón, colapso de conidios y alteraciones estructurales en el hongo (Ayed *et al.*, 2021). Las especies de *Streptomyces* producen 2-etil-5-metilpirazina y disulfuro de dimetilo que inhiben el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de los hongos fitopatógenos (Gong *et al.*, 2022). COVs como etanotioato de S-metilo, 1,2-dimetildisulfano, ácido 2-metilpropanoico, ácido acético, ácido 3-metilbutanoico, undecan-2-ona, nonan-2-ona y 2-isopropil-5-metilciclohexano -1-ol son

producidos por actinomicetos *Nocardioopsis* sp., presentan la propiedad de inhibir el crecimiento micelial de los hongos fitopatogénos (Widada *et al.* 2021).

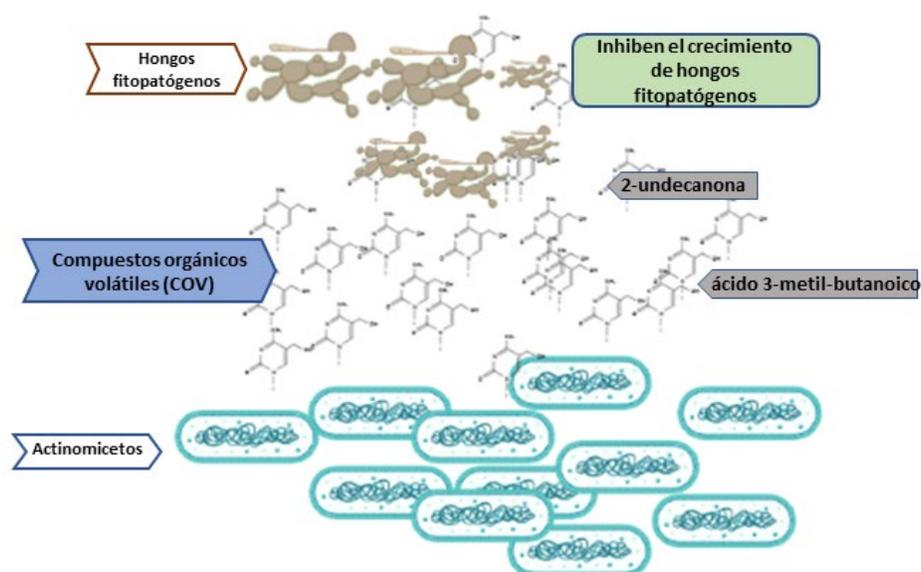


Figura 5. Producción compuestos volátiles por actinomicetos y su efecto en hongos fitopatogénos. Elaboración propia mediante Biorender.com.

2.7.6 Inducción de resistencia

La resistencia inducida se considera una estrategia para reemplazar los fungicidas sintéticos y puede lograrse por medio físico, químico y biológico (Romanazzi *et al.*, 2016). La resistencia en las plantas puede ser activada por un gran número de inductores tanto bióticos (hongos, bacterias, virus, fitoplasma, insectos) como abióticos (químicos y físicos) y es conocida como resistencia inducida (Meena *et al.*, 2020a). Se conocen dos tipos de resistencia inducida: resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR) y están mediadas por fitohormonas, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET). La SAR, depende de la molécula señal del SA y la ISR depende del JA y ET (Vlot *et al.*, 2021).

La primera línea de reconocimiento de las plantas hacia los fitopatogénos es mediante los PRR (Receptores de reconocimiento de patrones) que reconocen compuestos microbianos, como la flagelina bacteriana o la quitina fúngica, llamados patrones moleculares asociados a fitopatogénos, microbios o daño (PAMP, MAMP o DAMP, respectivamente) (Mauch-Mani *et al.*,

2017). El reconocimiento de patrones moleculares se traduce en una primera línea (respuesta) de defensa llamada inmunidad activada por PAMP, MAMP y DAMP (PTI) (Bigeard *et al.*, 2015).

Existen muchos fitopatógenos exitosos que han desarrollado factores de virulencia para evadir o suprimir la PTI, como pueden ser, fitotoxinas, polisacáridos extracelulares y efectores proteicos (Pel y Pieterse, 2013). A su vez, las plantas presentan una segunda línea de defensa en la que las proteínas receptoras de resistencia (R) NB-LRR (repetición rica en leucina y unión a nucleótidos) median el reconocimiento de moléculas efectoras específicas del atacante, lo que resulta en inmunidad activada por efecto (ETI) (Cook *et al.*, 2015). Este sistema de resistencia es denominado gen-por-gen, los genes R de la planta confieren resistencia al fitopatógeno que contiene, a su vez, los genes correspondientes de avirulencia (Avr) (Dodds *et al.*, 2006). Además, la ETI está asociada con la respuesta hipersensible (HR), una fuerte defensa local que conduce a la muerte celular programada en el sitio de la infección (Bigeard *et al.*, 2015).

La SAR está asociada con la acumulación de proteínas (PR) relacionadas con la patogénesis con actividad antimicrobiana, que contribuyen a la resistencia y es eficiente contra un amplio espectro de fitopatógenos, nemátodos y plantas parásitas (Benhadj *et al.*, 2019). Sin embargo, la resistencia sistémica inducida no activa directamente las respuestas de defensa de la planta, sino que activa la planta a un estado de 'alerta', de modo que un futuro ataque de fitopatógenos será respondido de manera fuerte y eficiente. Esta respuesta provoca un aumento de los niveles de compuestos fenólicos en las plantas, lignificación en el sitio de infección por fitopatógenos, aumento de la concentración de ROS y de compuestos antimicrobianos como fitoalexinas (Shoresh *et al.*, 2010).

Al respecto, Singh y Gaur (2017) demostraron el aumento significativo de enzimas relacionadas con la defensa, en el cultivo de garbanzo tratado con *Streptomyces* spp., como la fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y el polifenol oxidasa (PPO). La PAL inicia la ruta del fenilpropanoide, lo que resulta en la biosíntesis de fitoalexinas o compuestos fenólicos y el PPO cataliza las sustancias fenólicas para sintetizar lignina, fortaleciendo la estructura de la pared celular (Avdiushko *et al.*, 1993). Awla *et al.* (2017) demostraron el incremento en el nivel de expresión de genes relacionados con la patogénesis, como quitinasa (cht-1), glucanasa (gns1), que son enzimas líticas que degradan la pared celular fúngica. Cheng *et al.* (2014) demostraron que *Streptomyces*

felleus presentó la capacidad para sintetizar enzimas de defensa como superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa (POD) y PAL. La SOD es responsables de la eliminación de especies reactivas de oxígeno para proteger a la planta del estrés oxidativo durante la invasión de fitopatógenos (Lamb y Dixon, 1997). La POD es una enzima que cataliza la oxidación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que tiene actividad antifúngica frente a diversos fitopatógenos y participa en varios procesos fisiológicos, como la lignificación, suberización y catabolismo de auxina (Hiraga *et al.*, 2001).

2.8 Principales características del quitosano

El quitosano, es el derivado más importante de la quitina, el cual, se obtiene por desacetilación termo-alcalina. Es un polímero lineal formado por monómeros de N-D-glucosamina (2-amino-2-desoxi- β -D glucopiranososa), unidos por enlace β -1-4 (Katiyar *et al.*, 2015). Por su parte, la quitina, es un bio-polímero natural abundante que se encuentra como parte estructural del exoesqueleto de los crustáceos, pared celular de los hongos y otros materiales biológicos (Mohan *et al.*, 2022) (Tabla 2). La quitina es un polisacárido lineal compuesto de 2-acetilamina-2-desoxi- β -D-unidades glucopiranososa (Peter *et al.*, 2020). En su estado puro es de color blanco o amarillento, es inodoro e insípido (Cheba, 2011). Es altamente hidrofóbico y por lo tanto es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos (Santos *et al.*, 2020).

La quitina tiene tres formas polimórficas denominadas quitina α , β y γ . La quitina α y β están compuestas de capas de cadenas de polisacáridos dispuestas de forma antiparalela y paralela, respectivamente, mientras que la quitina- γ contiene cadenas de polisacárido paralelas intercaladas con cadenas simples antiparalelas (Mekasha *et al.*, 2017). La quitina es la segunda fuente de carbono renovable más grande del mundo después de la celulosa con una producción de más de 10^{11} ton por año (Zargar *et al.*, 2015). Se utilizan dos tipos de métodos para obtener quitina el químico y biológico. El primero de ellos es un método que presenta desventajas (contaminación ambiental por los residuos generados), pero el corto tiempo de procesamiento todavía lo convierte en el tratamiento más utilizado comercialmente (Hamed *et al.*, 2016).

Tabla 2. Principales fuentes de obtención de la quitina.

Fuente	Especie	Referencias
Cucarachas	<i>Periplaneta americana</i>	Kaya <i>et al.</i> , 2015a
Arañas	<i>Caribena versicolor</i>	Machałowski <i>et al.</i> 2019
Escarabajos	<i>Goliathus orientalis</i>	Fournier <i>et al.</i> , 2020
Cangrejo	<i>Portunus segnis</i>	Hamdi <i>et al.</i> , 2017
Bryozoa	<i>Plumatella repens</i>	Kaya <i>et al.</i> , 2015b
Moluscos	<i>Chiton</i>	Rasti <i>et al.</i> , 2017
Cigala	<i>Nephrops norvegicus</i>	Sayari <i>et al.</i> , 2016
Camarón	<i>Penaeus monodon</i>	Srinivasan <i>et al.</i> , 2018
Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sun <i>et al.</i> , 2018
Hongo	<i>Penicillium camembertii</i>	Aili <i>et al.</i> , 2019

El quitosano se describe de acuerdo al grado de desacetilación y peso molecular. El grado de desacetilación establece el contenido de grupos amino libres y puede ser utilizado para diferenciar entre quitina y quitosano (Taşkın *et al.*, 2014). En general, cuanto mayor es el grado de desacetilación, mayor es la solubilidad en condiciones ácidas, mayor carga positiva, por lo tanto, una actividad antimicrobiana mayor (Tolaimate *et al.*, 2003). La principal diferencia entre la quitina y quitosano es el contenido de grupos amino, y sus propiedades fisicoquímicas, relacionadas con la floculación, quelación y funciones biológicas (Xia *et al.*, 2011).

A diferencia de la quitina, el quitosano no se encuentra en especies de animales y rara vez se encuentra en la naturaleza, sin embargo, los hongos sintetizan quitina y quitosano en sus paredes celulares (Nwe *et al.*, 2009). El quitosano en adición de ácidos orgánicos como el ácido fórmico, el ácido acético y el ácido ascórbico, forma sales de ácido de quitosonium y se vuelve soluble en agua, lo que le confiere una mayor versatilidad en comparación con la quitina (Philibert *et al.*, 2017).

Debido a sus características, el quitosano ha sido utilizado; en el tratamiento de aguas residuales (Uragami *et al.*, 2015), cosmetología (Aranaz *et al.*, 2018), medicina (Ahsan *et al.*, 2018), industria farmacéutica (Khan *et al.*, 2019), industria alimentaria y de bebidas (Rocha *et al.*, 2017), industria del papel (Song *et al.*, 2018), entre otros. En la agricultura, el quitosano ha sido utilizado para inducir la resistencia en las plantas (González-Peña Fundora *et al.*, 2022),

para aumentar la capacidad antagonista de microorganismos benéficos (El Amerany *et al.*, 2020) y para incrementar la productividad de los cultivos (Torres-Rodríguez *et al.*, 2018).

2.8.1 Propiedades antimicrobianas del quitosano

La actividad antimicrobiana del quitosano está influenciada principalmente por el tipo de microorganismo, peso molecular, grado de desacetilación, la concentración del inóculo, temperatura, medio de cultivo, pH, entre otros. Los tipos de microorganismos sensibles al quitosano se dividen en cuatro grupos; bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, hongos sensibles y hongos resistentes (Palma-Guerrero *et al.*, 2010).

El quitosano es más activo en la superficie celular de los hongos o bacterias lo que conduce a afectaciones en la permeabilización de la membrana celular (Wang *et al.*, 2015). Esta interacción es principalmente electrostática, debido a la presencia de grupos aminos (NH^{3+}) de la glucosamina y su capacidad de interactuar con componentes de la superficie de carga negativa de muchos microorganismos (lipopolisacárido en bacterias Gram negativas, ácido teicoico en bacterias Gram positivas, fosfolípidos de la membrana celular de hongos), provocando alteraciones extensas a la superficie celular, lo cual conduce a la pérdida de la integridad de la pared y la membrana, fuga de material intracelular que resulta en la muerte celular (Ma *et al.*, 2017; Mauro *et al.*, 2022) (Fig. 6). Li *et al.* (2015) demostró que el mecanismo antimicrobiano del quitosano se debía a las interacciones de los grupos catiónicos (NH^{3+}) con las membranas celulares cargadas negativamente, que, en consecuencia, aumentaban la permeabilidad y la lisis de la membrana.

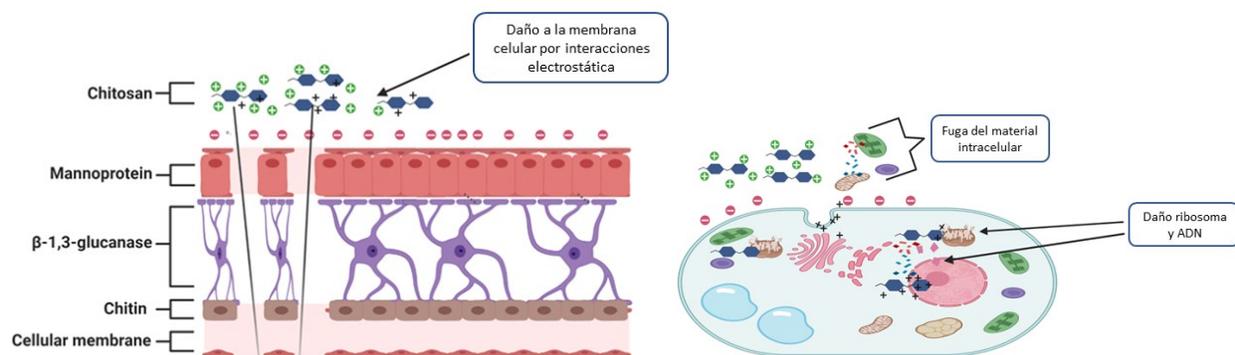


Figura 6. Actividad antimicrobiana del quitosano en las células. Tomado de Torres-Rodriguez *et al.*, 2021.

El quitosano también inhibe el crecimiento microbiano mediante la quelación de nutrientes y metales esenciales (Zn, Cu, Co, Mn, Ni, Cd) (Divya *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2004) demostró que cuando se quelaban iones Zn, se fortalecía la carga positiva en el grupo amino del quitosano, aumentando su capacidad de interactuar con los componentes de la superficie celular de los microorganismos. Además, causa daños en los ribosomas y el ADN, el quitosano (especialmente de bajo peso molecular), puede penetrar la pared celular de los microorganismos y unirse al ADN, esto puede conducir a la inhibición de la síntesis de ADN/ARN y la interrupción de la síntesis de proteínas (Schelegueda *et al.*, 2016). Así mismo, el quitosano en la superficie de la célula puede formar una membrana de polímero que evita que los nutrientes entren en la célula (Liu *et al.*, 2004). Además, induce mecanismos de defensa en las plantas, como la producción de especies reactivas de oxígeno, y la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como quitinasa, β-1,3-glucanasa (Liu *et al.*, 2019).

2.8.2 Efecto del quitosano en los hongos fitopatógenos

El quitosano es eficiente en la inhibición de la germinación de esporas, el alargamiento del tubo germinal y el micelio de los hongos fitopatógenos. El mecanismo antifúngico del quitosano implica la alteración y ruptura de la pared celular que interfiere directamente sobre el crecimiento de los fitopatógenos (Chun y Chandrasekaran, 2019). La permeabilización de las membranas plasmáticas de los fitopatógenos por el quitosano depende de los ácidos grasos que la componen, las membranas de los hongos sensibles al quitosano son ricas en ácidos grasos poli-insaturados (FFA) (ácido linolénico). Los hongos resistentes tienen membranas enriquecidas

con ácidos grasos saturados (palmítico o el ácido esteárico) (Palma-Guerrero *et al.*, 2010). Lopez-Moya *et al.* (2015) demostraron que el quitosano permeabiliza la membrana celular de *Neurospora crassa*, desencadenando la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la muerte celular, la producción de ROS intracelular oxida los FFA de las membranas celulares, permeabilizando la membrana plasmática y provocando la lisis celular.

2.8.3 Reconocimiento molecular del quitosano

En *Arabidopsis sp.*, se ha demostrado que la quinasa 1 (CERK1) receptora de quitina, es fundamental en el reconocimiento del patrón molecular asociado a fitopatógenos (Miya *et al.*, 2007). El quitosano es considerado un patrón molecular asociado a microbios (MAMP) en busca de un PRR (Zheng *et al.*, 2021). Se ha demostrado la afinidad de una proteína específica (lectina) para oligómeros de glucosamina mediante cromatografía de afinidad de quitosano a partir de células cultivadas de *Rubus fruticosus* L. La lectina puede ser un receptor de oligómeros derivados de quitosano con actividad inductora de respuestas de defensa hacia los fitopatógenos (Liénart *et al.*, 1991).

En el cultivo de tabaco y en la membrana plasmática de *Arabidopsis sp.* se determinaron proteínas de unión al quitosano (Yin *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2016). La proteína del tabaco es de 75 kD, similar al receptor de quitina CERK1, sin embargo, los estudios realizados no son suficientes para determinar si es un receptor. Por otra parte, la proteína de *Arabidopsis sp.* es pequeña (12 kD), lo que sugiere no ser un receptor (Yin *et al.*, 2016). También, se ha demostrado la interacción de quitosano marcado con fluorescencia con las células de la hoja de trigo y la interacción de quitosano con las proteínas de la membrana plasmática, como la W5G2U8_WHEAT (una proteína quinasa receptora potencial asociada a la pared), W5HY42_WHEAT y W5I0R4_WHEAT (serina/treonina proteína quinasa similar al receptor S de lectina de tipo G), como potenciales receptores de quitosano (Liu *et al.*, 2018).

Otro punto de vista propone que el quitosano no tiene receptores específicos en plantas. En este sentido, se ha establecido que la propiedad catiónica de quitosano permite la unión con la membrana plasmática de la planta. Sin embargo, otro material catiónico oligomérico (poli-L-lisina) no puede inhibir la unión de quitosano a la membrana de colza, por lo tanto, la unión no

sólo depende de la propiedad catiónica (Yin *et al.*, 2013). La complejidad estructural del quitosano dificulta su comprensión, por lo que aún no se ha esclarecido el receptor del quitosano en las plantas (Li *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

México es el principal exportador de tomate en el mundo, sin embargo, este cultivo es sensible a especies de *Fusarium*, las cuales, ocasionan pérdidas en la producción. Su principal método de control son los fungicidas sintéticos, sin embargo, éstos ocasionan resistencia en los fitopatógenos y efectos negativos al medio ambiente, la salud humana y animal. En la actualidad el uso de microorganismos como agentes de biocontrol es una alternativa a la aplicación de los fungicidas sintéticos. Los actinomicetos de origen terrestre presentan actividad antifúngica hacia varios fitopatógenos, sin embargo, los actinomicetos de origen marino pueden presentar mayor actividad de biocontrol, debido a sus condiciones de crecimiento. Se desconoce si el uso de actinomicetos marinos en conjunto con quitosano puede incrementar la eficiencia en el control de la pudrición ocasionada por *F. solani* en plantas de tomate.

4. HIPÓTESIS

Si la aplicación de actinomicetos aislados de ambientes terrestres y quitosano ha aumentado la protección del cultivo de tomate hacia los fitopatógenos, entonces, los actinomicetos aislados de ambientes marinos y quitosano protegerán al cultivo de tomate de *Fusarium* spp. mediante sus mecanismos antagónicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de actinomicetos marinos y quitosano para el control de *Fusarium solani* en plantas de tomate.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar, identificar y determinar la patogenicidad de los aislamientos de *Fusarium* spp.
2. Aislar e identificar actinomicetos marinos aislados de sedimentos de mangle.
3. Determinar *in vitro* la actividad antifúngica de actinomicetos marinos hacia *F. solani*.
4. Determinar la producción de sideróforos por actinomicetos marinos y su actividad antifúngica hacia *F. solani*.
5. Evaluar la producción de compuestos volátiles por actinomicetos marinos y su efecto antifúngico hacia *F. solani*.
6. Cuantificar *in vitro* el efecto antifúngico del quitosano hacia *F. solani*.
7. Evaluar el efecto de biocontrol de actinomicetos marinos y quitosano hacia *F. solani* en plantas de tomate.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp.

6.1.1 Aislamiento

Se realizó una colecta de raíces de plantas de tomate con síntomas de fusariosis en una huerta comercial ubicada en El Carrizal (Fig. 8), Baja California Sur, México, ubicada a 23°47'00.8" latitud norte y 110°17'40.3" latitud oeste. El muestreo se realizó en un transecto en banda y se colectaron raíces de plantas que presentaban marchitez, amarillamiento de hojas y ahorcamiento del tallo (Fig. 7).



Figura 7. Toma de muestras A: Plantas de tomate que presentan síntomas de fusariosis; B: Toma de muestras de raíces; C: Síntomas de marchitez y amarillamiento; D: Raíces plantas infestadas.

Las muestras se colocaron en bolsas de plástico estériles, se depositaron en un contenedor y se transportaron al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR) para su procesamiento. Trozos de raíces de 5 mm fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 2% por 30 s. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel absorbente. Los trozos de raíces fueron sembrados en placas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA, Difco 39 g L⁻¹) más estreptomycinina (0.1 g L⁻¹) y ampicilina (0.1 g L⁻¹) y se incubaron a 28 °C por 6 días. Las colonias se purificaron mediante la técnica de cultivo monospórico, se transfirió una espора individual a las placas de Petri con PDA y se conservaron en tubos inclinados a 4 °C.



Figura 8. Área de estudio de la finca El Carrizal.

6.1.2 Identificación morfológica

La identificación macroscópica de los aislados de *Fusarium* spp., se determinó mediante el color, diámetro de la colonia (mm), esporulación y tipo de micelio (Summerell *et al.*, 2003). Las características microscópicas (macroconidios, microconidios y clamidosporas) de cada hongo se determinaron utilizando un microscopio marca Nikon Eclipse E 200 con aumento de 40x, a través de las claves taxonómicas de Summerell *et al.* (2003).

6.1.3 Pruebas de patogenicidad

Cada hongo fue cultivado en PDA a 28 °C por 6 días. La concentración de cada fitopatógeno fue ajustada a 1×10^6 conidios mL⁻¹ utilizando una cámara de Neubauer. Se cultivaron plantas de tomate variedad saladet en bandejas de germinación de 200 cavidades utilizando como sustrato COSMOPEAT, a 25 °C, 80% RH y 12 h luz en una cámara de crecimiento Convairon (marca y modelo). Después de 25 días, las plantas se les recortó un tercio de las raíces y se sumergieron en la suspensión de conidios de cada fitopatógeno por 15 min previo al trasplante. Como control, un lote de plantas sin fitopatógeno fue sumergido solo en agua destilada estéril. Las plantas fueron mantenidas a 28 °C, 80% RH y 12 h luz en una cámara de crecimiento Convairon por 26 días. Se determinó la severidad de la enfermedad mediante la escala de Marlatt *et al.* (1996): 1 = Plantas sin síntomas; 2 = Ligera clorosis y marchitez o retraso de crecimiento; 3 =

Moderada clorosis y marchitez o retraso de crecimiento; 4 = Grave clorosis y marchitez o retraso de crecimiento; 5 = Plantas muertas. Además, se cuantificaron variables de crecimiento de las plantas como: altura, diámetro del tallo, peso fresco de la raíz y el porcentaje de incidencia de la enfermedad (% DI) (Saravanakumar *et al.*, 2016) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DI} = (P_i / T_P) \times 100\% \quad (1)$$

Dónde: P_i es el número de plantas infectadas y T_P es el total de plantas. Se comprobaron los postulados de Koch, se realizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.1.4 Micrografías

Se tomaron 0.5 cm² del tejido inoculado con el aislado y se fijó con glutaraldehído al 2% (v/v) por 5 min. Después, cada muestra se lavó con agua destilada estéril y se realizó una deshidratación parcial con gradientes ascendentes de etanol (30, 50, 70, 80, 95 y 100%, v/v) por 20 min. Las muestras se secaron a punto crítico con CO₂ y se cubrieron con oro para ser analizadas por MEB (Hitachi®, S-300 N).

6.1.5 Identificación molecular

Se realizó la extracción de ADN de acuerdo con la metodología de Ochoa *et al.* (2007). Se amplificó la región ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA utilizando los primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Los primers fueron sintetizados por la empresa Sigma-Genosys (EUA). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems con un período de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (los cuales comprendían una desnaturalización a 95 °C por 1 min, la alineación por 30 s a 50 °C y una extensión de 1 min a 72 °C), con una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA®), y fueron teñidos con gel red (0.057 µL mL⁻¹). Se visualizaron en un transiluminador marca BioDoc-IT²®. Los productos de PCR fueron secuenciados por la empresa Genewiz®. Las regiones amplificadas de: ITS1–ITS4 del aislado se compararon con las secuencias

almacenadas en la base de datos del GenBank del NCBI por medio del alineamiento local de secuencias nucleotídicas utilizando el programa (BLAST).

6.1.6 Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético usando el programa MEGA 7.0.21 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar *et al.*, 2018). Se utilizó la secuencia ITS obtenida de Genewiz y secuencias de otras especies del NCBI para la construcción del árbol filogenético. Estas fueron seleccionadas en una búsqueda de secuencias nucleotídicas homólogas a la secuencia ITS obtenida. Un total de 18 secuencias del género *Fusarium* fueron alineados usando MUSCLE (Edgar, 2004) con la configuración predeterminada y por medio del programa Gblocks (Talavera y Castresana, 2007) dentro de la plataforma Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008), donde se excluyeron los segmentos que tenían posiciones variables o gaps, eligiendo los bloques conservados a partir del alineamiento múltiple. Se utilizó la secuencia de *Phoma multirostrata* (Acceso GenBank: MG238549.1) como grupo externo. Con las secuencias curadas se determinó el modelo de evolución de ADN de mejor ajuste con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2018). También se realizó el análisis filogenético mediante el método de máxima parsimonia (MP), usando el modelo Kimura-2 parameter (Tamura, 1992) y distribución Gama y 10,000 repeticiones (bootstrap). El árbol MP fue obtenido usando NNI (Nearest-Neighbor-Interchange).

6.2 Aislamiento e identificación de actinomicetos marinos

6.2.1 Recolección de muestra de suelo de mangle

Se colectaron 16 muestras de sedimento marino de manglares de cuatro sitios (Fig. 9) de muestreo del estero Zacatecas ubicado en La Paz, Baja California Sur, México ubicado a 24°9'30" latitud norte y 110°25'37" latitud oeste. La colecta de muestras se realizó a una distancia de 0-1, 1-3 y 3-5 m de la línea de costa, a una profundidad de 25 cm. Las muestras de sedimento fueron colectadas utilizando una barrena de suelo de 10 cm de diámetro. La porción central de las muestras superiores de 2 cm se extrajo con la ayuda de una cuchara estéril. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno estériles, que se almacenaron en frío para su uso posterior.



Figura 9. Área de muestreo en zonas de manglar de La Paz, Baja California Sur.

6.2.2 Aislamiento de actinomicetos de sedimentos de manglar

Las muestras de sedimento se dejaron secar a temperatura ambiente por 7 días. Se pesó 1 g de muestra de suelo y se suspendió en 9 mL de agua de mar estéril, se incubó por 20 min en baño de María a 60 °C y la solución resultante se diluyó en serie hasta 10^{-6} (Palla *et al.*, 2018). Se añadió 1 mL de cada dilución intermedia a 15 mL a los siguientes medios de cultivo: agar de caseína de almidón (ACA) (almidón 10 g, K_2HPO_4 2 g, KNO_3 2 g, caseína 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, $CaCO_3$ 0.02 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, agar 15 g, agua de mar 1L), agar levadura de extracto de Malta (ISP2: Extracto de malta 10 g, Extracto de levadura 4 g, Dextrosa 4 g, agar 20 g, Agua de mar 1L, pH ajustado a 7.2), agar de sales inorgánicas (ISP4: K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, NaCl 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $CaCO_3$ 2 g, almidón 10 g, agua de mar 1L, agar 20 g) (Shirling y Gottlieb, 1966) suplementado con ácido nalidíxico ($25 \mu g mL^{-1}$) y cicloheximida ($50 \mu g mL^{-1}$). Las placas fueron incubadas a 28 °C por 15 días. Posteriormente, cada colonia de actinomiceto fue purificada en ISP-2 y almacenada en glicerol al 20% a -80 °C.

6.2.3 Identificación morfológica de los actinomicetos

Los aislados de actinomicetos marinos se identificaron de acuerdo con las siguientes características morfológicas: tipo y color de micelio, textura, forma, borde y elevación de la colonia (Shirling y Gottlieb 1966) y tinción de Gram (Duraipandiyani *et al.*, 2010)

6.3 Antagonismo *in vitro* de actinomicetos marinos vs *F. solani*

Para determinar el antagonismo *in vitro* se colocó un disco de 0,5 cm de cada aislado de actinomiceto cultivado en ISP2 a 1 cm del borde de las placas Petri con PDA y en el centro de cada placa se puso un disco de 0,5 cm de *F. solani* proveniente de un cultivo de 7 días en PDA. Un grupo de placas Petri fueron inoculadas con una cepa de referencia de origen terrestre catalogada como ED48 de *Streptomyces* sp. proporcionada por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México. Otro grupo fue inoculado con el fitopatógeno más el fungicida sintético Carbendazim (6 mg mL⁻¹) y otro grupo sólo fue inoculado con *F. solani*. Las placas fueron incubadas durante 10 días a 28 °C. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR, %) del hongo con la fórmula: $[(R1-R2)/R1] \times 100\%$ donde R1=crecimiento radial de *F. solani* en la placa control y R2=crecimiento de *F. solani* en dirección hacia la colonia de actinomiceto (Azadeh *et al.*, 2010). Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.3.1 Actividad antimicrobiana en sobrenadantes de actinomicetos

Cada actinomiceto fue cultivado en ISP2 a 30 °C por 7 días. Posteriormente se añadieron 5 mL de agua estéril y las esporas se rasparon y transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de caldo caseína de almidón y se incubaron a 28 °C a 150 rpm por 2 días. Las células fueron cosechadas, lavadas y re-suspendidas en 25 mL de solución salina estéril, posteriormente 10 mL de cada inóculo se depositó en un matraz de 250 mL que contenía 100 mL de caldo nutritivo (mijo 10 g.L⁻¹, glucosa 10 g.L⁻¹, CaCO₃ 2 g.L⁻¹, NaCl 2,5 g.L⁻¹, peptona 3 g.L⁻¹, pH 7,2-7,4) y se incubó a 150 rpm y 28 °C por 12 días. El medio se centrifugó a 8000 x g. por 20 min a 4 °C, el sobrenadante se pasó a través de un filtro de membrana de 0,22 µm y se almacenó a 4 °C. 1 mL del sobrenadante de cada actinomiceto se colocó en un sensidisco a 1 cm del borde de las placas Petri con PDA y en el centro se colocó un disco de *F. solani*. Un grupo de

placas Petri fue inoculada con la cepa ED48, otro grupo fue inoculado con el fitopatógeno más el fungicida sintético Carbendazim (6 mg mL^{-1}) y otro grupo solo fue inoculado con *F. solani*. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR %) del hongo con la fórmula: $[(R1-R2)/R1] \times 100\%$ donde R1=crecimiento radial de *F. solani* en la placa control y R2=crecimiento de *F. solani* en dirección hacia la colonia de actinomiceto (Azadeh *et al.*, 2010). Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.4 Identificación molecular

El ADN se extrajo utilizando el método de Ochoa *et al.* (2007) modificado. Se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 para determinar la calidad y la concentración del ADN genómico extraído. La amplificación por PCR de la secuencia del gen 16S ARNr de los aislados P4T4; P4T3,5; P4M3,1; P4T3,6; se realizó utilizando los cebadores: 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-GGTACCTGTTACGACTT-3'). Los cebadores fueron sintetizados por la empresa Sigma-Genosys (EUA). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador marca Applied Biosystems con un periodo de desnaturalización de 3 min a $98 \text{ }^\circ\text{C}$, seguido de 30 ciclos (los cuales comprendían una desnaturalización a $94 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min, la alineación por 1 min a $52 \text{ }^\circ\text{C}$ y una extensión de 1 min a $72 \text{ }^\circ\text{C}$), con una extensión final de $72 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA®) y fueron teñidos con gel red ($0.057 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$). Se visualizaron en un transiluminador marca BioDoc-IT²®. Todos los productos de PCR fueron mandados a secuenciar (Genewiz). Las secuencias obtenidas se utilizaron para la búsqueda de homología de las secuencias de 16S utilizando BlastN con las secuencias depositadas en bases de datos públicas. La purificación de los productos de PCR se realizó utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick® de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La identificación se basó en el porcentaje de similitud ($> 97\%$ en comparación con las secuencias de bases de datos públicas, NCBI), según la homología de BLAST.

6.4.1 Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 7.0.21 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar *et al.*, 2018). La secuencia del gen 16S ARNr de los aislados se alineó

utilizando MUSCLE (Edgar, 2004) con la configuración predeterminada y por medio del programa Gblocks (Talavera y Castresana, 2007) dentro de la plataforma Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008), donde se excluyeron los segmentos que tenían posiciones variables o gaps, eligiendo los bloques conservados a partir del alineamiento múltiple. Con las secuencias curadas se determinó el modelo de evolución de ADN de mejor ajuste con el programa MEGA 7.0.21 (Kumar *et al.*, 2016), se realizó el análisis filogenético mediante el método de unión de vecinos (NJ), usando el modelo Tamura-3 parameter (Tamura, 1992) y distribución Gama y 10,000 repeticiones (bootstrap).

6.5 Producción de sideróforos por actinomicetos marinos

El ensayo de cromo azurol S (CAS) se utilizó para determinar la producción de sideróforos por los actinomicetos marinos (Schwyn y Neilands 1987). Las cepas se inocularon en el medio de ensayo CAS (0,0605 g de CAS, 0,0729 g de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 0,0027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2953 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,2135 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1250 g de NH_4Cl , 0,0375 g de KH_2PO_4 , 0,0625 g de NaCl , 15 g de agar, 1000 mL dd H_2O , pH 6,8) a 28 °C durante 10 días. Se establecieron tres repeticiones para el experimento. La secreción de sideróforos se evaluó según se formaran halos amarillos o anaranjados alrededor de las colonias.

6.5.1 Efecto del hierro sobre la actividad antifúngica de *F. solani*

La actividad antifúngica de los actinomicetos hacia *F. solani* se evaluó en placas Petri de papa dextrosa agar (PDA) (Qi *et al.* 2022). Los medios se suplementaron con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y EDTA- Na_2 , respectivamente. *F. solani* se sembró en PDA a 28 °C durante 7 días. Se inocularon dos discos de actinomicetos en los puntos simétricos del disco de *F. solani* (5 mm de diámetro). Las placas sin $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o EDTA- Na_2 se utilizaron como controles. Después de incubar a 28 °C durante 7 días, los diámetros de crecimiento de *F. solani* se midieron. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR %) de *F. solani*. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.6 Producción de compuestos orgánicos volátiles por actinomicetos marinos

Placas Petri con PDA se inocularon centralmente con un taquete de *F. solani*. Al mismo tiempo, otra placa con ISP2 se inocularon con actinomicetos, cubriendo toda la superficie de la placa (Djebaili *et al.*, 2021). Se retiraron las tapas de ambas placas y se pusieron en contacto las dos bases sembradas, de forma que el hongo quedara abajo. Se sellaron la unión de las dos bases con Parafilm y se incubaron a 28 °C por 7 días. Como control se utilizaron placas de PDA con *F. solani* con una base conteniendo medio ISP2 sin sembrar. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR %) de *F. solani*. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.7 Efecto antifúngico *in vitro* del quitosano hacia *F. solani*

Taquetes del *F. solani* (5 mm) se colocaron en el centro de placas de Petri de PDA con diferentes tratamientos de quitosano (1, 2 y 3 g L⁻¹) de bajo peso molecular (160 kDa, 85 % DD). Como tratamiento control se utilizó un grupo de placas Petri inoculado con el fitopatógeno más el fungicida sintético Carbendazim (6 mg mL⁻¹) y otro grupo solo fue inoculado con *F. solani*. Las placas de ensayo se incubaron a 28 °C durante 7 días. El crecimiento del micelio se midió cuando el micelio alcanzo los bordes de las placas de control con un vernier digital y se expresó como diámetro promedio (mm). Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR %) de *F. solani*. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.7.1 Efecto antifúngico del quitosano en la germinación de esporas

La suspensión de esporas de *F. solani* (1 × 10⁶ conidios mL⁻¹) se añadió al medio PDB que contenía concentraciones de quitosano (1, 2 y 3 g L⁻¹) se incubó durante 7 días a 28 °C con agitación (170 r/min). Como tratamiento control se utilizaron matraces con *F. solani* en PDB. Los micelios se filtraron a través de una malla (tamaño de poro, 30 µm), se lavaron con agua destilada y recogidos por centrifugación a 5.000 rpm (dos veces), fueron secados en una estufa, posteriormente se pesaron para calcular la biomasa de *F. solani*. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.7.2 Efecto de quitosano en la ultraestructura celular de *F. solani*

De los diferentes tratamientos del experimento del efecto antifúngico *in vitro*, se cortó una capa delgada superficial del agar con *F. solani*, para determinar los daños a la ultraestructura celular. Las muestras se colocaron sobre un cubreobjetos adheridos a un stub de aluminio. Se colocaron en una cámara saturada con OsO₄ (Tetraóxido de osmio), por 72 horas. Continuo con una deshidratación en una cámara con silica granulada y papel filtro, por una semana. Quedando completamente deshidratadas las muestras, se le sometió a un baño de oro, utilizando un Sputter Coater. Modelo Denton Vacuum, Desk II. Una vez recubiertas se observaron con un Microscopio Electrónico de Barrido. Mod S-3000N y un procesador de imágenes Quartz PCI.

6.8 Biocontrol de actinomicetos y quitosano hacia *F. solani* en tomate

6.8.1 Inóculo de actinomicetos, *F. solani* y concentración del quitosano

Las cepas actinomicetos A19 de origen marino y la ED48 de origen terrestre fueron seleccionadas para realizar los experimentos en condiciones *in vivo*, debido a que se consideraron representativas de las cepas que presentaban alta actividad antifúngica hacia *F. solani* en los ensayos de cultivo dual. Cada actinomiceto fue cultivado en ISP2 a 30 °C por 7 días. Posteriormente se añadieron 5 mL de agua estéril, las esporas se rasparon y transfirieron a tubos de plástico estériles de 5 mL con caldo de soya tripticaseina, se incubaron a 28 °C durante 48 h. Luego, se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo de ISP2 y se incubaron a 28 °C a 150 rpm por 5 días, el inóculo de cada cepa de actinomicetos se ajustó a 1×10^8 ufc mL⁻¹ (Díaz-Díaz *et al.*, 2022). *F. solani* fue cultivado en PDA a 28 °C por 7 días. Posteriormente se añadieron 5 mL de agua estéril, las esporas se rasparon y transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de PDA a 150 rpm por 5 días y el inóculo se ajustó a 1×10^6 conidios mL⁻¹. En el caso del quitosano se preparó como se describió anteriormente, se utilizó la concentración (3 g L⁻¹) de mayor inhibición hacia *F. solani* de las pruebas *in vitro*.

6.8.2 Tratamientos y condiciones de crecimiento

Las plantas de tomate variedad saladet se cultivaron en bandejas de germinación de 200 cavidades utilizando como sustrato COSMOPEAT, a 25 °C, 80% RH y 12 h luz en una cámara de

crecimiento Convairon. Después de 25 días las plantas se les recortaron un tercio de las raíces y se sumergieron en la suspensión de conidios de *F. solani* por 15 min, previo al trasplante.

Antes (24 h) y después (24 h) de la inoculación de *F. solani* se aplicaron los siguientes tratamientos: [T₁] A19 [T₂] ED48 [T₃] Quitosano [T₄] A19+Quitosano [T₅] ED48+Quitosano [T₆] Fungicida sintético (Carbendazim) y [T₇] Control (*F. solani*). En el caso de los actinomicetos (A19 y ED48) se realizó la inoculación de las cepas (1 mL) cerca del cuello de la raíz de las plantas de tomate y el quitosano se realizó aspersión foliar con un atomizador hasta la cobertura foliar completa de las plantas. Las plantas se trataron cada tres días con 1 mL de los actinomicetos cerca de la raíz y aspersión foliar del quitosano, hasta el final del periodo del experimento [53 días después de la siembra]. Las plantas fueron mantenidas a 28 °C, 80% RH y 12 h luz en una cámara de crecimiento Convairon por 28 días. Se tomaron muestras de tejido de hojas de los tratamientos y se almacenaron a -80 °C para determinar la actividad enzimática.

6.8.3 Evaluación de la severidad de la enfermedad

Se determinó la severidad de la enfermedad (SE) a los 28 días después de la aplicación de los tratamientos mediante la escala de Marlatt *et al.* (1996); 1 = Plantas sin síntomas; 2 = Ligera clorosis y marchitez o retraso de crecimiento; 3 = Moderada clorosis y marchitez o retraso de crecimiento; 4 = Grave clorosis y marchitez o retraso de crecimiento; 5 = Plantas muertas. Posteriormente, se estimó un índice SE utilizando la siguiente fórmula:

$$SE (\%) = \left[\sum_{i=1}^5 ni(sti) / (N \times K) \right] \times 100 \quad (2)$$

En el que ni = número de plantas en la etapa de desarrollo SE, sti = valor de la etapa SE (1-5), N = número total de plantas evaluadas y K = nivel de mayor escala (5).

Además, se cuantificaron variables de crecimiento de las plantas de tomate como; altura, diámetro del tallo, peso fresco y seco de la raíz y el porcentaje de incidencia de la enfermedad (% DI) (Saravanakumar *et al.*, 2016) mediante la siguiente fórmula:

$$\% DI = (Pi / TP) \times 100\% \quad (3)$$

Dónde: P_i = es el número de plantas infectadas y TP = es el total de plantas. El diseño experimental fue completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

6.9 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software STATISTICA 10.0 (software StatSoft, Tulsa, OK) y se utilizó la prueba de Fisher LSD ($P < 0,05$) para la separación de medias. Los datos se probaron para determinar la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Bartlett antes de realizar análisis de varianza (ANOVA). Para la incidencia de la enfermedad (DI) de los experimentos *in vivo*, los datos se analizaron por separado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas a pesar de que se transformaron logarítmicamente, arcoseno o raíz cuadrada. Los valores medios se compararon utilizando la prueba de comparación de Dunn en ($P < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp.

7.1.1 Características morfológicas macroscópicas

Se obtuvieron ocho aislados catalogados como: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 y H8 de *Fusarium* spp a partir de muestras de raíces de tomate, que provenían de plantas con síntomas de marchitez vascular. Los aislados mostraron variación en su coloración, el H1 presentó una coloración gris, H2 y H5 amarillo claro, el H3 y H4 blanco-crema, el H6 y H7 violeta y el H8 amarillo café (Fig. 10).

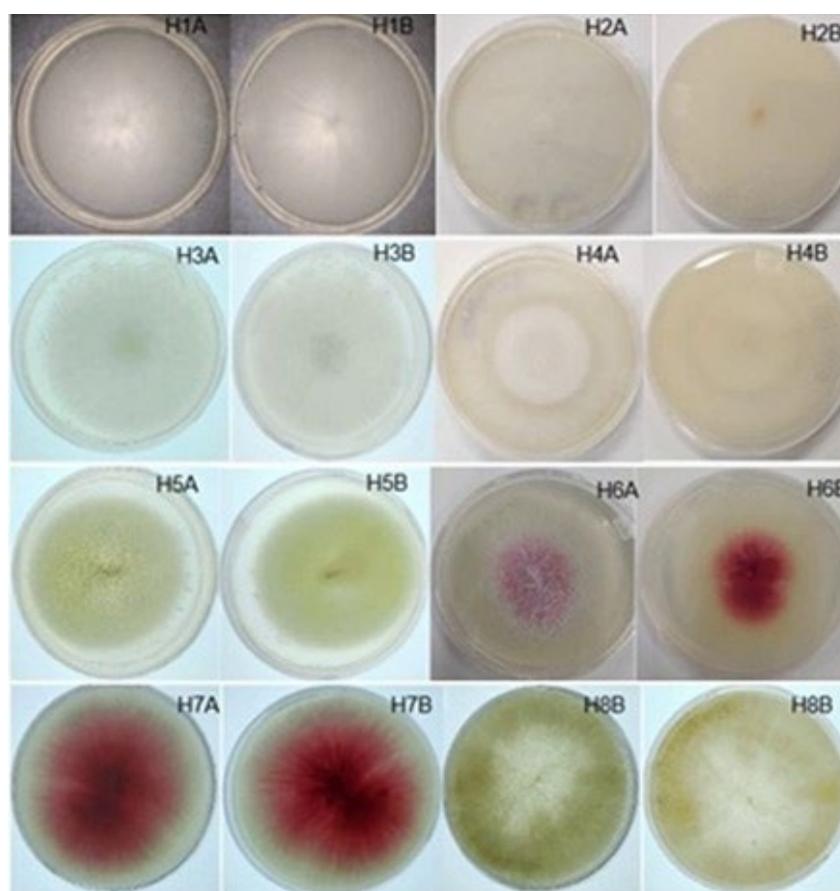


Figura 10. Características morfológicas de los aislamientos de *Fusarium* spp., aislados de plantas sintomáticas de tomate, cultivados en medio de cultivo PDA a los 6 días a 28 °C (Aislados: H 1-8; A: Anverso, B: Reverso).

Las colonias de cada aislado presentaron variación en color y diámetro de la colonia, esporulación y tipo de micelio (Tabla 3). Los aislados H3 y H8 registraron el diámetro máximo de la colonia al 6 día después de la incubación, el aislado H5 registró el diámetro mínimo de la

colonia con 62.63 mm, los aislados H4, H5, H6, H7 y H8 fueron los de mayor esporulación y el H1 y H2 los de menor, el tipo de micelio vario desde aéreo escaso hasta abundante de coloración blanco algodonoso.

Tabla 3. Características morfológicas de las colonias de *Fusarium* spp. obtenidos de raíces de tomate.

Aislado	Color de la colonia	DC (mm)	CE	Tipo de micelio
H1	Gris	63.33 ± 1.06 e	+	Micelio aéreo escaso, es blanco de color crema
H2	Amarillo claro	72.81 ± 0.78 c	+	Micelio aéreo abundante, blanco, algodonoso
H3	Blanco a color crema	75.12 ± 0.67 a	++	Micelio aéreo escaso, blanco, algodonoso y hialino
H4	Blanco a color crema	73.77 ± 0.67 b	+++	Micelio aéreo denso, blanco, algodonoso y hialino
H5	Amarillo claro	62.63 ± 0.86 f	+++	Micelio aéreo abundante, blanco, algodonoso
H6	Violeta pálido	64.44 ± 0.85 e	+++	Micelio aéreo blanco rosado, flocoso y abundantes
H7	Violeta oscuro	69.49 ± 1.41 d	+++	Micelio aéreo blanco rosado, flocoso y abundantes
H8	Amarillo café	75.32 ± 0.58 a	+++	Micelio aéreo abundante, blanco, algodonoso, hialino

DC: Diámetro de la colonia; CE: Categoría de esporulación: +++ abundante ++ buena + moderada. Cada valor es la media de cinco repeticiones ± Desviación estándar. Letras iguales en las columnas no difieren significativamente según Fisher (P<0,05).

7.1.2 Características microscópicas

En los aislados obtenidos se confirmó la presencia de estructuras microscópicas típicas de *Fusarium* spp. Se observaron macroconidios, microconidios y en algunos aislados se confirmó la producción de clamidosporas (Fig. 11).

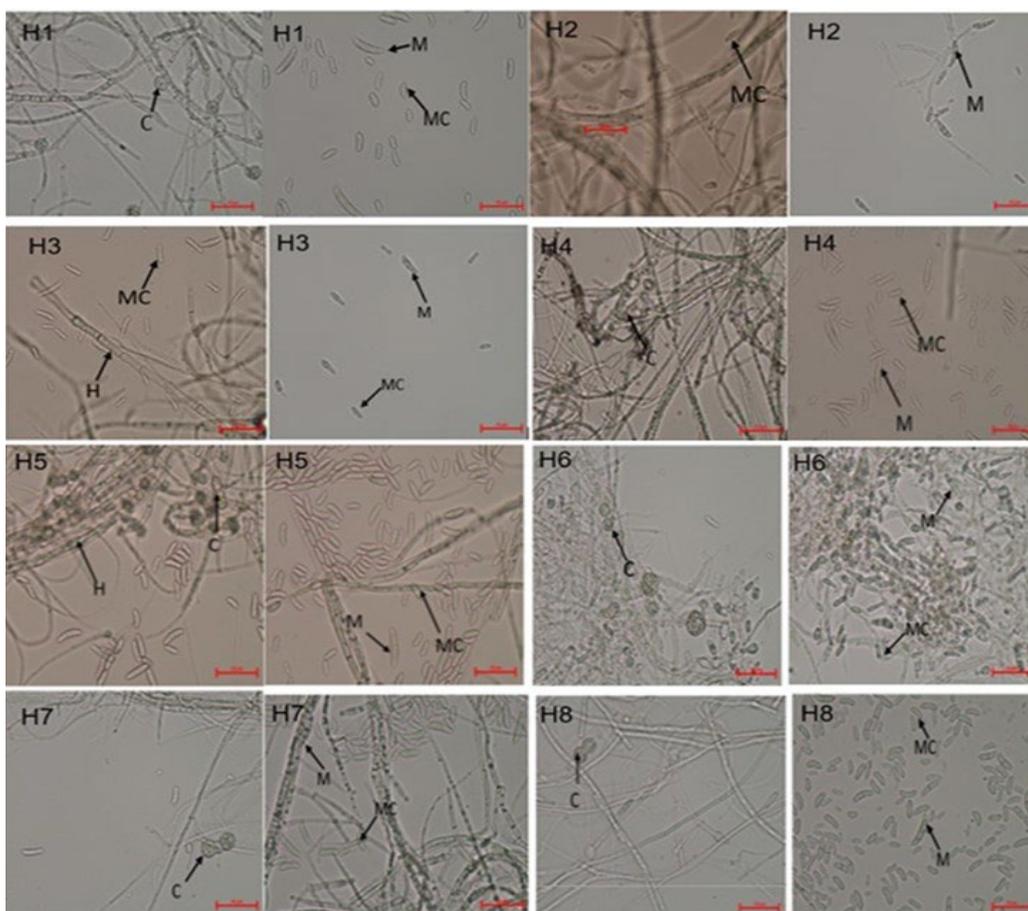


Figura 11. Características microscópicas de los aislados de *Fusarium* spp., procedentes de tomate en CLA (Aislados: 1-8, H: Hifas, M: Macroconidios, MC: Microconidios, C: Clamidiosporas).

Los aislados presentaron diferencias en las estructuras de macroconidios, microconidios y en la presencia de clamidiosporas. Los macroconidios observados mostraron formas semicurvas, rectas y delgadas, de 3 a 5 septos, con un tipo de célula apical desde romo hasta papilado y célula basal en forma de pie o muesca ligera. Los microconidios presentaron forma reniforme y fusiforme, desde 0 a 1 septo. En algunos aislados se confirmó la producción de clamidiosporas pareadas de paredes lisas (Tabla 4).

Tabla 4. Características de las estructuras de reproducción de los aislados de *Fusarium* spp.

Aislado	Macroconidio				Microconidio		Clamidospora
	Forma	Septo	Célula apical	Célula basal	Forma	Septo	
H1	Semicurva	3	Romo	Forma de pie	Reniforme	0	Pareada, pared lisa
H2	Recta, delgada	3-4	Romo	Muesca ligera	Reniforme	0-1	-----
H3	Semicurva	3	Romo	Forma de pie	Reniforme	0	-----
H4	Curvatura dorsiventral	4-5	Estrechamiento	Forma de pie	Reniforme	0	Pareada, pared lisa
H5	Semicurva	3	Romo	Muesca ligera	Reniforme	0-1	Verrugosa simple
H6	Curvatura dorsiventral	3-5	Papilado	Forma de pie	Reniforme, fusiforme	0	Pareada, pared lisa
H7	Curvatura dorsiventral	3-5	Papilado	Forma de pie	Reniforme, Fusiforme	0	Pareada, pared lisa
H8	Semicurva	3-5	Romo	Forma de pie	Reniforme, fusiforme	0-1	Pareada, pared lisa

7.1.3 Patogenicidad de *Fusarium* spp.

De los ocho aislados de *Fusarium* spp., solo el H3, H6, H7 y H8 fueron patogénicos, ocasionando un 100% de incidencia de la enfermedad con diferentes niveles de severidad en las plantas (Tabla 5). El aislado H8 se identificó como el más virulento, exhibió una infección sistémica dentro de los 15 días y causó la mortalidad de todas las plantas evaluadas, por lo que fue seleccionado para una caracterización MEB adicional e identificación molecular. Cada fitopatógeno fue re-aislado comprobando los postulados de Koch.

Tabla 5. Severidad de los aislados de *Fusarium* spp. y su efecto en variables de crecimiento en tomate.

Aislado	Severidad ^a	Altura (mm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso fresco de raíz (mg)
Control	0	233.6 ± 6.02 a	4.1 ± 0.18 a	55.0 ± 2.00 a
H3	3	166.4 ± 5.41 b	2.2 ± 0.13 b	32.4 ± 2.19 b
H6	4	125.2 ± 8.70 c	1.6 ± 0.11 c	28.4 ± 1.81 c
H7	4	129.0 ± 6.44 c	1.6 ± 0.08 c	27.8 ± 1.64 c
H8	5	75.4 ± 4.04 d	1.2 ± 0.05 d	18.4 ± 1.51 d

Severidad^a: 1=plantas sin síntomas; 2=ligera clorosis y marchitez; 3=moderada clorosis y marchitez; 4=grave clorosis y marchitez; 5=planta muerta. Cada valor es la media de cinco repeticiones ± Desviación estándar. Letras iguales en las columnas no difieren significativamente según Fisher (P<0,05).

La altura, diámetro del tallo y el peso fresco de la raíz de las plantas disminuyó cuando la severidad de la enfermedad aumentó (Tabla 5). Las plantas del tratamiento control mostraron la mayor altura de la planta con 233.6 mm, diámetro del tallo con 4.1 mm y peso fresco de la raíz con 55 mg, el aislado H8 presentó la menor altura con 75.4 mm, diámetro del tallo con 1.2 mm y el peso fresco de la raíz con 18.4 mg.

Las estructuras como microconidios, macroconidios y clamidosporas del aislado H8 se observaron por microscopía electrónica de barrido (MEB). El fitopatógeno presentó macroconidios delgados con una longitud de 18-25 µm, con células semicurvas de 3 septos, los microconidios presentaron un septo y tuvieron una longitud de 5-8 µm. Los microconidios, macroconidios y clamidosporas se encontraron en los sistemas vasculares de las plantas de tomate, por lo tanto, el aislado H8 fue el causante de los síntomas y daños asociados por *Fusarium* spp. (Fig. 12).

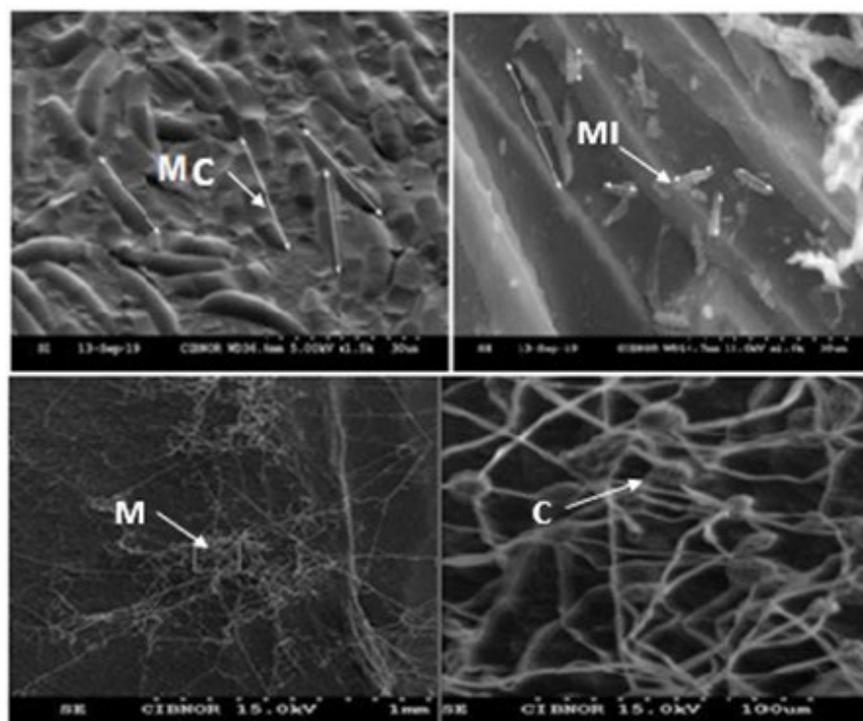


Figura 12. Estructuras del aislado H8 de *Fusarium* spp. presentes en los sistemas vasculares de las plantas de tomate. MC: Macroconidio; MI: Microconidio; M: Micelio; C: Clamidosporas.

7.1.4 Identificación molecular y análisis filogenético

La amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del aislado H8 fue de un tamaño de 550 pb. Su secuencia mostró una identidad del 100% con las secuencias de *F. solani* disponibles en la base de datos NCBI. En el análisis filogenético, las secuencias ITS de H8 se agruparon junto con otros aislados de *F. solani* como un solo grupo (Fig. 13).

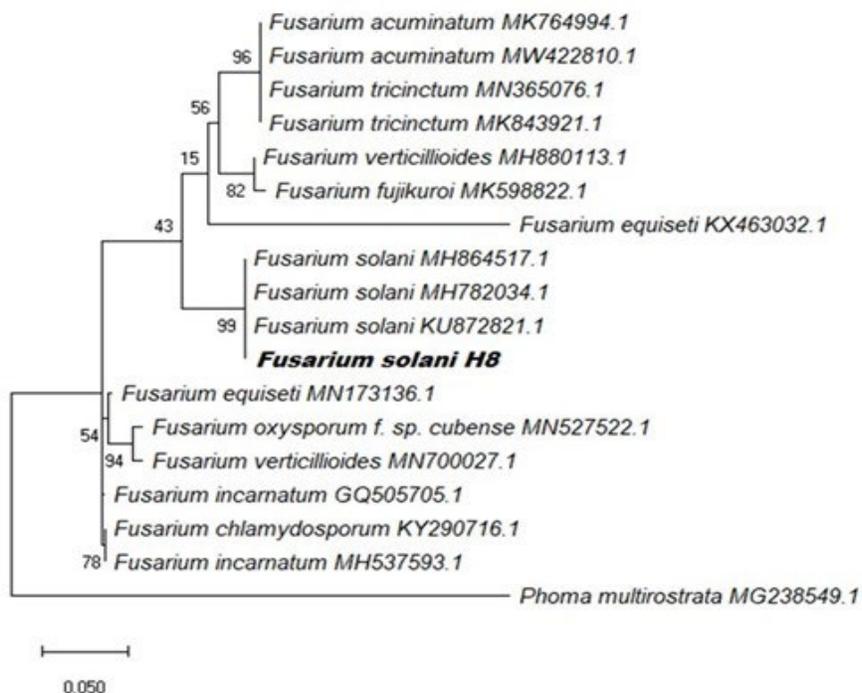


Figura 13. Árbol filogenético basado en la región ITS1-5.8s-ITS2 del hongo H8 aislado de plantas de tomate enfermas por *Fusarium* spp. Los valores de bootstrap se indican como porcentajes sobre los nodos en este análisis (10,000 bootstrap). El número de acceso a GenBank se encuentra después de los nombres de cada especie.

7.2 Aislamiento e identificación morfológica de actinomicetos marinos

Se obtuvieron un total de 30 actinomicetos de sedimentos de manglar (Fig. 14). Los aislados presentaron diferencias en el tipo de micelio, color, la textura, formas, bordes y elevación. Todos los aislados fueron identificados como bacterias Gram positivas.



Figura 14. Características morfológicas de los actinomicetos aislados de zonas de manglar.

El tipo de micelio de los aislados, vario desde sustrato hasta aéreo, el color del micelio vario desde blanco, amarillo y rosado claro, la textura fue rugosa, cremosa y plegada, la forma de las colonias fueron circular, irregular y puntiforme, los bordes de las colonias fueron ondulados, lobulados, redondeados y filamentosos y la elevación varía desde plana hasta convexa (Tabla 6).

Tabla 6. Características morfológicas de los aislados obtenidos de sedimentos de mangles.

Aislado	Tipo de micelio	Color del micelio	Textura	Forma de la colonia	Bordes de la colonia	Elevación de la colonia	Reacción de Gram
A1	Sustrato	Gris amarillento	Rugosa	Irregular	Lobulado	Plana	+
A2	Sustrato	Amarillo pálido	Plegada	Irregular	Ondulado	Plana	+
A3	Sustrato	Gris amarillento	Rugosa	Circular	Ondulado	Plana	+
A4	Aéreo	Amarillo oscuro	Creмоса	Irregular	Lobulado	Plana	+
A5	Sustrato	Gris amarillento	Rugosa	Irregular	Ondulado	Plana	+
A6	Sustrato	Amarillo claro	Rugosa	Circular	Redondeado	Plana	+
A7	Sustrato	Amarillo pálido	Plegada	Circular	Ondulado	Plana	+
A8	Aéreo	Amarillo pálido	Creмоса	Puntiforme	Ondulado	Convexa	+
A9	Sustrato	Amarillo claro	Rugosa	Irregular	Ondulado	Plana	+
A10	Sustrato	Gris	Rugosa	Irregular	Rizoide	Plana	+
A11	Sustrato	Rojo	Creмоса	Irregular	Ondulado	Plana	+
A12	Sustrato	Amarillo	Creмоса	Irregular	Ondulado	Plana	+
A 13	Sustrato	Amarillo claro	Creмоса	Circular	Ondulado	Plana	+
A 14	Sustrato	Marrón oscuro	Rugosa	Irregular	Rizoide	Convexa	+
A 15	Sustrato	Rosado claro	Creмоса	Circular	Redondeado	Plana	+

A 16	Sustrato	Gris claro	Creмоса	circular	Ondulado	Plana	+
A 17	Aéreo	Gris oscuro	Creмоса	Irregular	Ondulado	Plana	+
A 18	Aéreo	Amarillo	Creмоса	Circular	Ondulado	Plana	+
A 19	Sustrato	Amarillo	Plegada	Rizoide	Filamentoso	Plana	+
A 20	Aéreo	Gris oscuro	Creмоса	Irregular	Ondulado	Convexa	+
A 21	Sustrato	Amarillo claro	Creмоса	Puntiforme	Ondulado	Plana	+
A 22	Sustrato	Blanca	Creмоса	Circular	Ondulado	Plana	+
A 23	Aéreo	Amarillo	Creмоса	Puntiforme	Ondulado	Convexa	+
A 24	Sustrato	Rosado claro	Creмоса	Circular	Redondeado	Plana	+
A 25	Aéreo	Amarillo oscuro	Creмоса	Irregular	Lobulado	Plana	+
A 26	Aéreo	Gris oscuro	Creмоса	Irregular	Ondulado	Convexa	+
A 27	Sustrato	Amarillo claro	Rugosa	Circular	Redondeado	Plana	+
A 28	Aéreo	Amarillo	Creмоса	Circular	Ondulado	Plana	+
A 29	Sustrato	Amarillo	Creмоса	Circular	Ondulado	Plana	+
A 30	Sustrato	Amarillo	Plegada	Circular	Redondeado	Plana	+

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de recuperación de actinomicetos en los tres medios de cultivos utilizados, para las cuatro zonas de estudio. En la misma se aprecia que el medio ISP2 (50%) mostró el mayor número de recuperación de microorganismos, seguido de ACA (30%) y ISP4 con (20%).

Tabla 7. Cantidad de aislados obtenidos de cuatro estaciones de manglares de La Paz, Baja California Sur en diferentes medios de cultivos.

Medio de cultivo	Número de aislados	Representación (%)
Agar de caseína de almidón (ACA)	9	30.00
Agar de sales inorgánicas (ISP4)	6	20.00
Agar levadura de extracto de malta (ISP2)	15	50.00
Total de aislados	30	100

7.3 Pruebas de antagonismo *in vitro* de actinomicetos frente a *F. solani*

Solo cuatros aislados mostraron actividad antifúngica (A20, A19, A18, A15) frente a *F. solani*. Los aislados restantes no lograron inducir inhibición, por lo tanto, no se incluyeron en estudios posteriores. El aislado A19 mostró la mayor actividad antagonista con PICR de 72%, el cual no mostró diferencias significativas en relación con el tratamiento con fungicida sintético y si con el resto de los aislados, el A15 mostró el menor PICR con un 39,53% (Fig. 15a). Estos resultados sugieren que los cuatros aislados que mostraron actividad antifúngica pueden ser considerados como potenciales agentes de biocontrol hacia *F. solani*. De los cuatros aislados que mostraron actividad antifúngica, solamente dos (A19, A18) mostraron efecto en sobrenadante. El A19 mostró un PICR de 44,92%, el cual no mostró diferencias significativas con el ED48 de origen terrestre y si con el resto de los tratamientos (Fig. 15b).

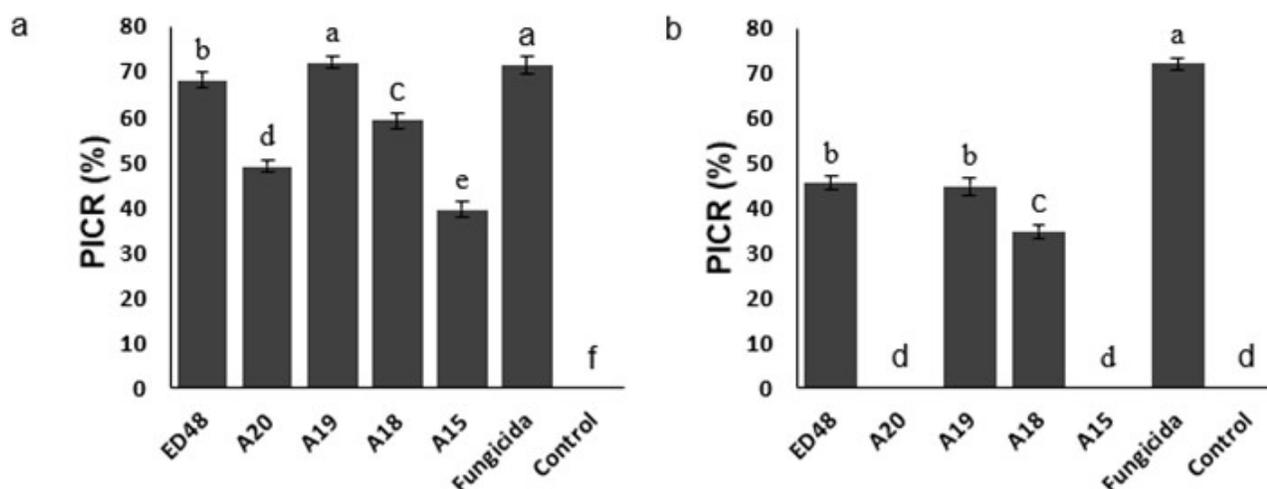


Figura 15. Antagonismo *in vitro* de actinomicetos marinos contra *F. solani*. (a) Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de actinomicetos contra *F. solani*. (b) PICR de sobrenadantes de actinomicetos contra *F. solani*. Letras iguales en las columnas no difieren significativamente según Fisher ($P < 0,05$).

7.4 Identificación molecular y análisis filogenético

Los aislados que mostraron actividad antifúngica (A15, A18, A19, A20) frente a *F. solani* fueron identificados molecularmente. Los productos de PCR amplificados de la región 16S fueron de un tamaño de 1500 pb para los aislados. Los resultados BLAST de las secuencias mostraron que los aislados A19 y A20 eran similares en un 99.56% a especies de *Streptomyces* sp y A15 y A18 un 99.50% a especies de *Nocardiopsis lucentensis*. El análisis filogenético derivado de secuencias del gen 16S de A20 se agrupó junto con otros aislados de *Streptomyces griseoflavus* y A19 se agrupó en el clado de *Streptomyces* sp. El análisis filogenético de A18 y A15 los agrupó con *Nocardiopsis lucentensis* como un solo grupo (Fig. 16).

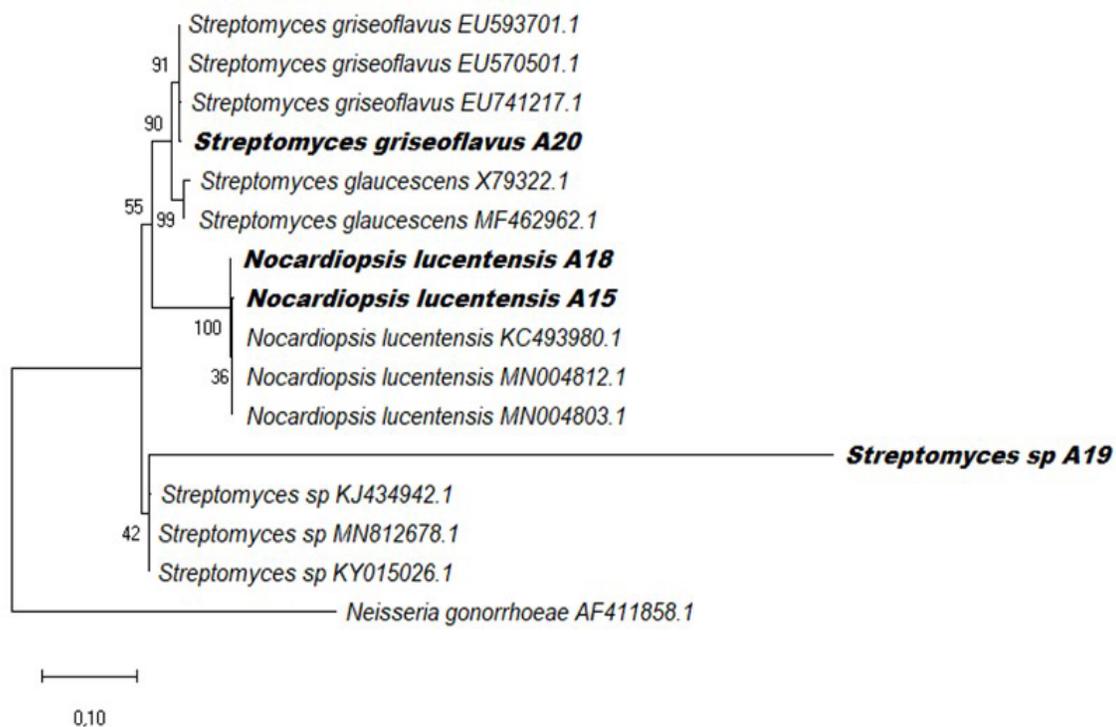


Figura 16. Árbol filogenético basado en el gen 16S ARNr de los actinomicetos A20, A19, A18 y A15 aislados de ambientes marinos. Los valores de bootstrap se indican como porcentajes sobre los nodos en este análisis (10,000 bootstrap). El número de acceso a GenBank se encuentra después de los nombres de cada especie.

7.5 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos de las cepas de actinomicetos (A20; A19; A18; A15 y ED48) se identificó por la aparición de halos naranjas o amarillos alrededor de las colonias de los actinomicetos. Sin embargo, existieron diferencias en el halo de producción de sideróforos (Tabla 8). La cepa A19 mostró el mayor halo de producción de sideróforos con 12.2 mm, mostrando diferencias significativas con el resto de los actinomicetos.

Tabla 8. Producción de sideróforos por actinomicetos marinos.

Actinomicetos	Producción	Halo producción (mm)	
ED48	+	7.68 c	±0.31
A20	+	7.60 c	±0.13
A19	+	12.20 a	±0.21
A18	+	8.80 b	±0.20
A15	+	7.80 c	±0.30

Cada valor es la media de cinco repeticiones ± Desviación estándar. Letras iguales en las columnas no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.

Los resultados del co-cultivo de los actinomicetos y *F. solani* en condiciones de deficiencia de hierro o ricas en hierro, demostraron que en presencia de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuvieron un efecto negativo sobre el antagonismo de los actinomicetos hacia el fitopatógeno (Tabla 9). Por el contrario, la actividad antagónica de los actinomicetos se potenció en presencia de EDTA-Na_2 . Los resultados indicaron que la competencia por el hierro mediada por sideróforos estaba involucrada en la inhibición de *F. solani*.

Tabla 9. Inhibición crecimiento radial de *F. solani* por sideróforos.

Actinomicetos	% Inhibición de <i>F. solani</i> ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	% Inhibición de <i>F. solani</i> (PDA)	% Inhibición de <i>F. solani</i> (EDTA-Na_2)
ED48	43.66 ±0.36 c	65.76 ±0.66 b	74.28 ±1.37 a
A20	26.22 ±0.65 c	32.41 ±0.43 b	36.16 ±0.83 a
A19	48.13 ±0.35 c	62.41 ±0.41 b	77.42 ±0.84 a
A18	38.49 ±0.58 c	56.42 ±0.75 b	68.20 ±0.99 a
A15	19.22 ±0.44 c	25.45 ±0.44 b	33.25 ±0.35 a
Control	0.0	0.0	0.0

Cada valor es la media de cinco repeticiones ± Desviación estándar. Letras iguales en las filas no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.

7.6 Producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs)

Solo dos actinomicetos mostraron actividad antifúngica por COVs (A19 y A18) hacia *F. solani*. La cepa A19 mostró la mayor actividad antagonista con PICR de 76.75%, el cual mostró diferencias significativas con el resto de los actinomicetos, el A18 mostró un PICR de 63.62% (Fig. 17).

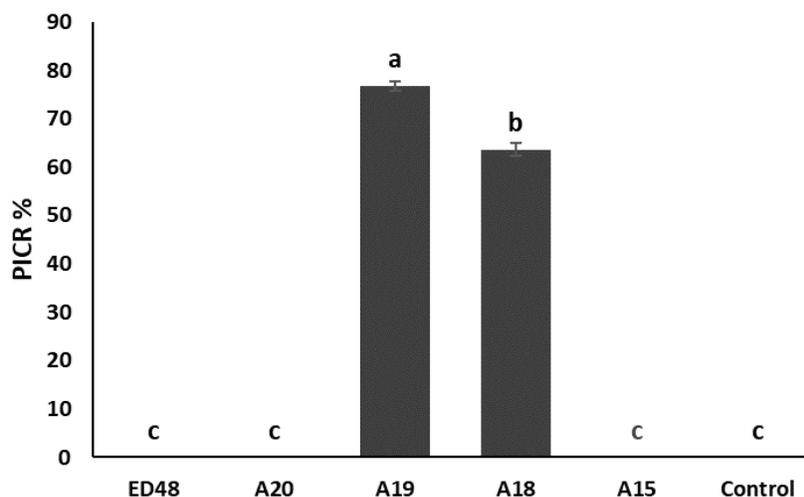


Figura 17. Porcentaje de inhibición de COVs de actinomicetos hacia *F. solani*. Las barras es la media de cinco repeticiones \pm Desviación estándar. Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.

7.7 Efecto antifúngico *in vitro* del quitosano hacia *F. solani*

Los tres tratamientos (1, 2 y 3 g L⁻¹) mostraron actividad antifúngica hacia *F. solani*. El tratamiento T3 (3 g L⁻¹) mostró la mayor actividad antagonista con PICR de 81.43%, el cual mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El tratamiento T3 fue superior a la aplicación del fungicida sintético. El tratamiento T1 (1 g L⁻¹) mostró el menor PICR con un 20.89% (Fig. 18a). Los tres tratamientos de quitosano redujeron la producción de biomasa de *F. solani*. El T3 presentó diferencias significativas con los tratamientos T1 y T2 de quitosano, obteniendo la mayor reducción de biomasa con 0.64 g respecto a estos, sin embargo, fue menor al fungicida sintético (Fig. 18b).

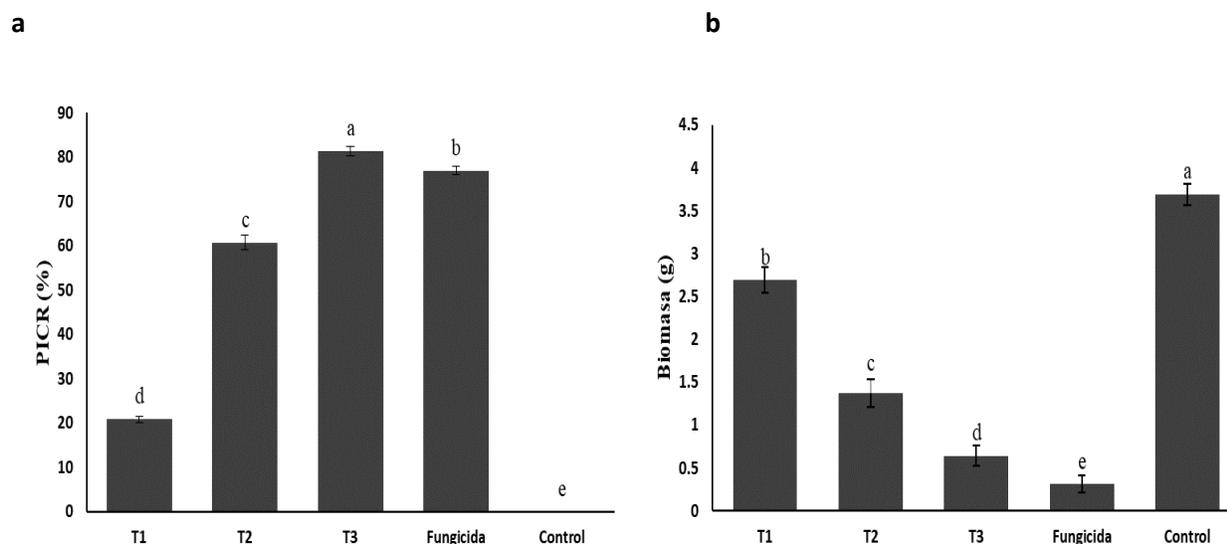


Figura 18. (a) Porcentaje de inhibición micelial de quitosano hacia *F. solani*. (b) Porcentaje de inhibición de biomasa de quitosano hacia *F. solani*. Las barras es la media de cinco repeticiones \pm Desviación estándar. Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.

Todos los tratamientos de quitosano dañaron la ultraestructura celular de *F. solani* respecto al tratamiento control (Fig. 19). El daño ultraestructural fue evidente en las hifas de las células tratadas con quitosano (T1, T2 y T3), se observó que presentaban lisis celular, además, el micelio y esporas de *F. solani* estaban malformadas e irregulares. Los mayores daños ultraestructural de *F. solani* se observaron en el T3, en el mismo se puede apreciar que las esporas (T3 b y c) y el micelio (T3 a) se encontraban completamente malformados, respecto al tratamiento control (Control a, b y c), el cual no presentó ningún daño en su ultraestructura celular.

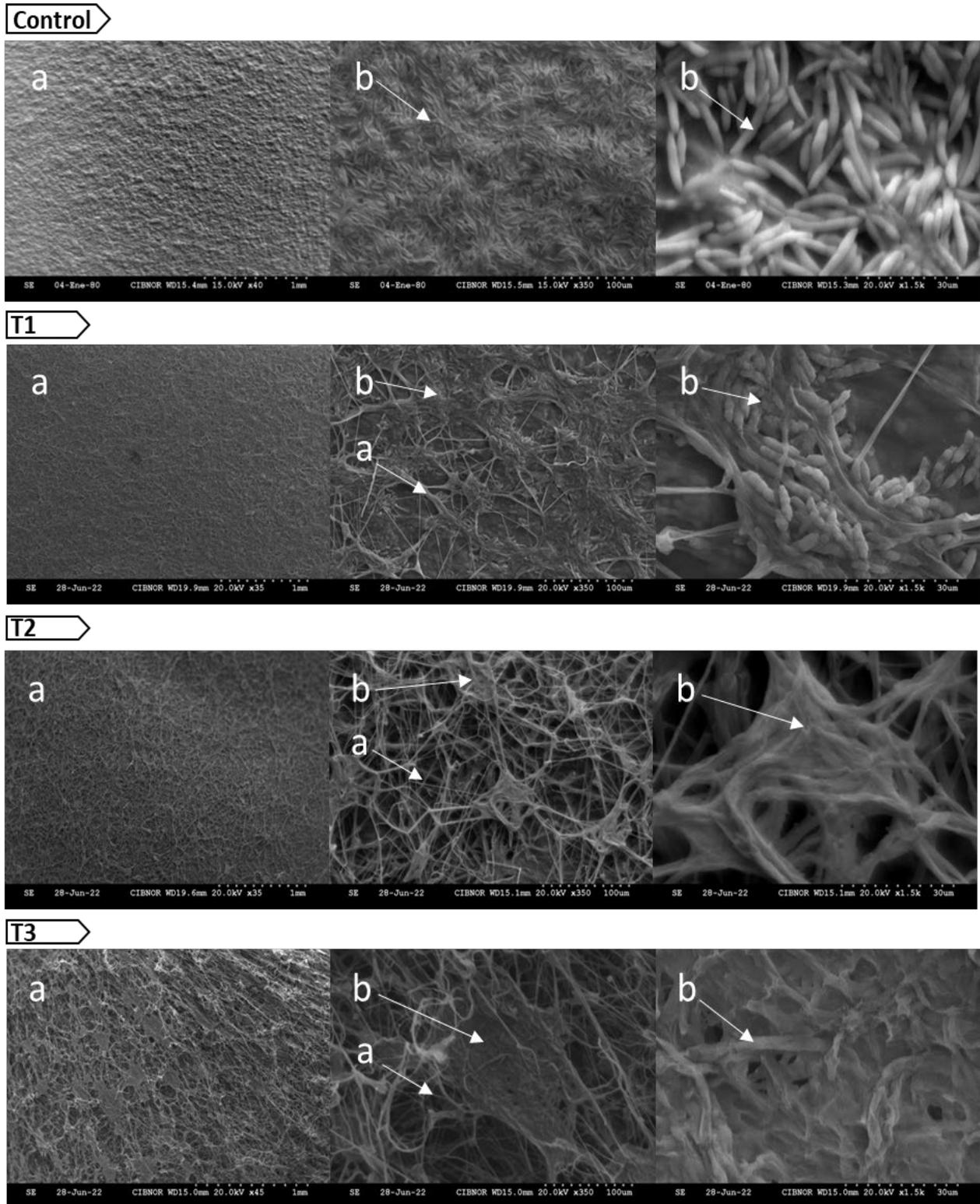


Figura 19. Efecto de quitosano en la ultraestructura celular de *F. solani*. a: micelio de *F. solani*; b: esporas *F. solani*. (microscopía electrónica de barrido).

7.8 Biocontrol de actinomicetos y quitosano hacia *F. solani* en plantas de tomate

Todos los tratamientos aplicados como, actinomicetos (A19 y ED48), quitosano y la combinación entre ellos, presentaron mayor efecto de protección en las plantas de tomate hacia *F. solani* que la aplicación del fungicida sintético (Carbendazim). El tratamiento A19+Q de origen marino presentó el mayor efecto de protección de las plantas de tomate en las variables altura de la planta (355.97 mm), peso seco de la raíz (85.02 mg) y longitud de la raíz (64.30 mm) mostrando diferencias significativas con el resto los tratamientos aplicados, sin embargo, no mostró diferencias significativas con el tratamiento Q (quitosano) en la variable diámetro del tallo. La combinación de los actinomicetos (A19 y ED48) con quitosano, mostraron los mayores resultados en las variables de crecimiento que cuando se aplicaron en forma individual. Los resultados menores en las variables de crecimiento de las plantas de tomate afectadas por *F. solani* se obtuvieron con la aplicación del fungicida sintético (Tabla 10).

Tabla 10. Biocontrol de actinomicetos y quitosano hacia los daños ocasionados por *F. solani* en plantas de tomate.

Tratamientos	Altura de la planta (mm)	Diámetro del tallo (mm)	Peso seco de la raíz (mg)	Longitud de la raíz (mm)
A19	335.80 b ±1.07	4.28 bc ±0.12	72.04 c ±0.96	51.13 c ±1.21
A19+Q	355.97 a ±0.71	4.43 ab ±0.12	85.02 a ±1.82	64.30 a ±0.72
ED 48	307.78 d ±0.52	4.25 c ±0.15	67.27 e ±0.81	45.25 e ±0.49
ED48+Q	333.43 b ±0.66	4.35 abc ±0.19	79.45 b ±1.35	59.32 b ±0.68
Q	322.08 c ±1.10	4.48 a ±0.10	69.76 d ±0.63	48.15 d ±0.67
Carbendazim	284.82 e ±0.78	3.99 d ±0.11	59.32 f ±0.78	39.24 f ±0.53
Control	165.90 f ±0.46	2.03 e ±0.16	32.14 g ±1.34	18.48 g ±0.92

Control: *F. solani*; Q: quitosano (3 g L⁻¹). Cada valor es la media de cinco repeticiones ± Desviación estándar. Letras iguales en las columnas no difieren significativamente para p < 0,05 según Fisher.

Los tratamientos de actinomicetos y quitosano en plantas de tomate inoculadas con *F. solani* mostraron mayores resultados en la reducción de la enfermedad respecto a la aplicación del fungicida sintético. La SE varió desde 13.89 a 25% para las plantas tratadas con *Streptomyces* sp. y quitosano, mostrando todos los tratamientos un efecto significativo en la reducción de la enfermedad en comparación con el tratamiento control (*F. solani*). Los mejores resultados de los tratamientos de actinomicetos (A19 y ED48) como agentes de biocontrol se obtuvieron

cuando se combinaron con la aplicación de quitosano. El mayor efecto de la reducción de la enfermedad se obtuvo con el tratamiento A19+Q de origen marino con 13.89% (Fig. 20).

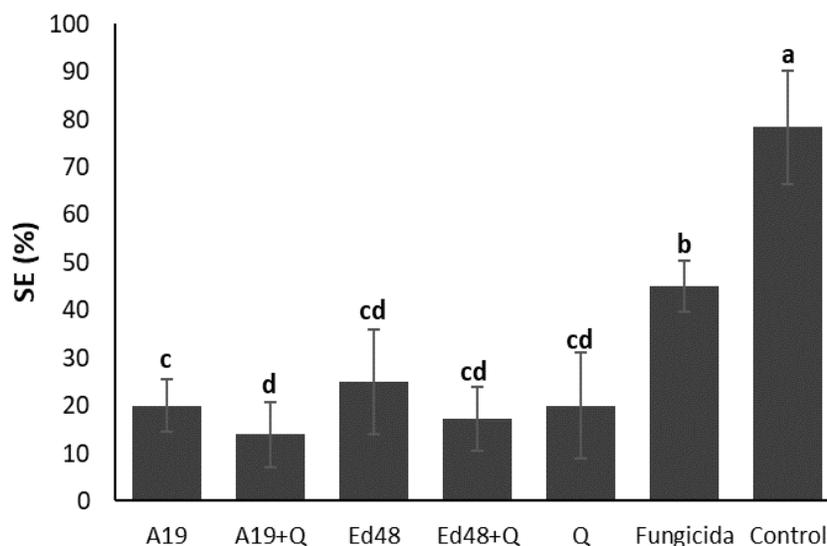


Figura 20. Severidad de la enfermedad (SE) ocasionada por *F. solani* en plantas de tomate tratadas con actinomicetos y quitosano. Las barras es la media de seis repeticiones \pm Desviación estándar. Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0,05$ según Fisher.

La incidencia de la enfermedad (DI) fue menor en las plantas de tomate tratadas con los tratamientos de actinomicetos y quitosano, superando a la aplicación del fungicida sintético. La combinación de los actinomicetos con quitosano, mostraron mejores resultados que la aplicación individual de los mismos. En el tratamiento de actinomiceto marino y quitosano (A19+Q) se observaron los valores de DI más bajo (16.67%), mostrando diferencias significativas con el resto de los tratamientos. El tratamiento control (*F. solani*) presentó 100% de DI en las plantas de tomate (Fig. 21).

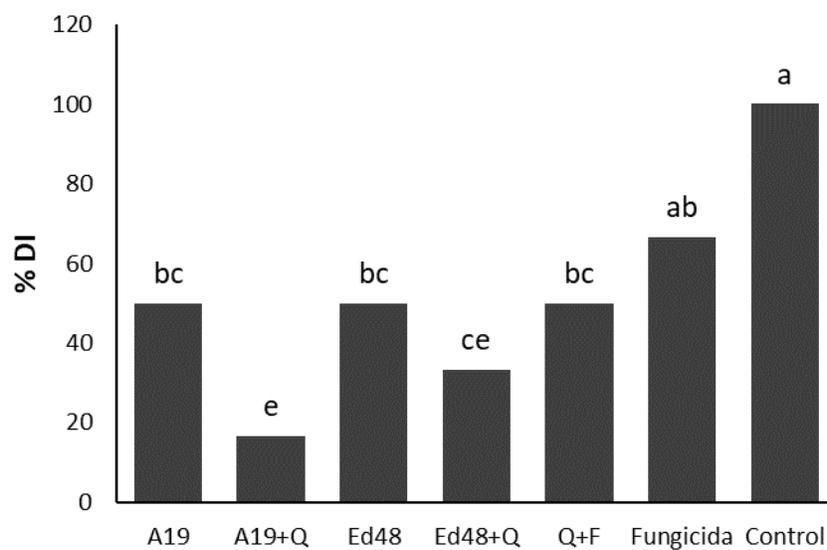


Figura 21. Incidencia de la enfermedad ocasionada por *F. solani* en plantas de tomate tratadas con actinomicetos y quitosano. Las barras es la media de seis repeticiones. Las columnas con letras iguales no difieren significativamente según la prueba de comparaciones múltiples para proporciones de Dunn ($p < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento, identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp.

El aislamiento e identificación de la especie, a través de criterios morfológicos (color de la colonia, macroconidio, microconidio, clamidosporas) y moleculares, es fundamental para poder realizar un correcto manejo integrado de la enfermedad y toma de decisiones. En esta investigación se obtuvieron ocho aislados de *Fusarium* spp. de plantas que presentaban síntomas de marchitez vascular, clorosis de hojas y afectación en el crecimiento.

Los ocho aislados presentaron características morfológicas diferentes, que van desde micelio algodonoso hasta micelio flocoso y de coloración desde gris pálido, amarillo claro, y violeta oscuro. Según Leslie y Summerell, (2008) esta variabilidad en la morfología es común entre diferentes especies de *Fusarium*. Villanueva-Arce *et al.* (2013) describieron colonias de *Fusarium* spp. con formas, texturas y colores diversos (blancas, naranjas, morado-oscuro y púrpura). Así mismo, Duarte Leal *et al.* (2016) reportaron variaciones en el color de la colonia de los aislados de *Fusarium* spp. de color rojo, violeta, salmón y amarillo.

Respecto a las estructuras de reproducción como macroconidio, microconidio y clamidosporas, también, se obtuvieron diferentes formas entre los ocho aislados obtenidos, resultados similares a los reportados por Sivakumar *et al.* (2018) en el cultivo de tomate, reportaron diferencias entre las estructuras de macroconidio, microconidio y clamidosporas, al estar en presencia de diferentes especies de *Fusarium* spp. Estas diferencias entre los aislados obtenidos en este experimento nos hacen pensar que estamos en presencia de diferentes especies de *Fusarium* spp.

Dado que las especies de *Fusarium* spp. pueden persistir en el suelo o en los restos del cultivo después de la cosecha durante mucho tiempo sin huéspedes, se dificulta su manejo y control (Summerell *et al.*, 2003). De los ocho aislados de *Fusarium* spp. obtenidos, únicamente cuatro fueron patogénicos y los mismos presentaron diferente porcentaje de daño y virulencia. Se ha reportado que existen diferencias en la virulencia entre aislados de *Fusarium* spp. (Murugan *et al.*, 2020). Al respecto, Nirmaladevi *et al.* (2016) obtuvieron variación en la virulencia de

diferentes aislados de *Fusarium* spp. en el cultivo de tomate, el 45% de las cepas evaluadas eran altamente virulentas y el 30% moderadamente virulentas. También, Chang *et al.* (2018) en el cultivo de soya, encontraron una correspondencia, entre la afectación de *Fusarium* spp. y la disminución de los parámetros de crecimiento. Resultados similares también reportaron van der Does *et al.* (2019) en el cultivo de tomate. La patogenicidad de *Fusarium* spp., puede estar mediada por la acción de enzimas líticas (endopoligalacturonasa, exopoligalacturonasas, endoxilanasas y endopectato-liasa) que despolimerizan todos los componentes de la pared celular, como son la celulosa, las pectinas y las proteínas (extensinas). Además, estas enzimas le sirven para inactivar los componentes proteicos de defensa de la planta, como son las quitinasas y β -1,3-glucanasas (Roncero *et al.*, 2000).

La identificación morfológica permite la identificación hasta el nivel de género, pero es limitada para diferenciar entre diferentes especies (Summerell *et al.*, 2003). Las similitudes que presentan las estructuras de reproducción de *Fusarium* spp., hacen compleja su identificación a nivel de especie (Al-Fadhal *et al.*, 2019). Singha *et al.* (2016) observaron diferencias en la identificación de especies de *Fusarium*, cuando los aislados de *Fusarium* spp. se identificaron morfológicamente y molecularmente en base a ITS. Las técnicas de biología molecular, en particular la PCR, han proporcionado un enfoque alternativo para la detección e identificación de muchos fitopatógenos del suelo y plantas (Vincelli y Tisserat, 2008). La región de ITS se estudia para la identificación de hongos, debido a la especificidad de especie de esta región y proporciona una mejor resolución a nivel de subespecie y, por lo tanto, el análisis de secuencias es una opción superior para los estudios filogenéticos (Okubara *et al.*, 2005). Los dendogramas obtenidos con el algoritmo Máxima Parsimonia indicó que la secuencia obtenida en el presente estudio se agrupa con otras secuencias de *F. solani*. Según la morfología de la colonia y la secuencia de la región ITS, el aislado altamente virulento H8, se identificó como *F. solani*.

8.2 Aislamiento e identificación de actinomicetos de sedimentos de manglar

Aunque, existe poca información sobre el aislamiento de actinomicetos de los suelos de manglar (Palla *et al.*, 2018), se ha sugerido su potencial biotecnológico debido a su adaptación a la alta salinidad (Barka *et al.*, 2016). Por esto, es fundamental que actinomicetos de hábitats

inexplorados en condiciones extremas, puedan considerarse como nuevas fuentes de agentes de biocontrol.

La disponibilidad de nutrientes es uno de los principales factores que determinan el crecimiento de los actinomicetos. La mayoría de los actinomicetos pueden usar una amplia variedad de compuestos como la glucosa, el almidón y los aminoácidos como fuente de energía; a diferencia de otros grupos bacterianos que solo favorecen el compuesto simple de carbono y nitrógeno (Malek *et al.*, 2014). Se empleó un pretratamiento (calentamiento) a las muestras de suelo de manglares, ya que estudios previos han demostrado que los regímenes de precalentamiento generalmente estimulan el aislamiento de los actinomicetos al eliminar el predominio de microorganismos no deseados que pudieran inhibir la colonización de los actinomicetos de crecimiento lento (Niyomvong *et al.*, 2012).

Además, la presencia de agua de mar en los medios de cultivo podría promover el crecimiento de actinomicetos marinos al imitar el ambiente de manglar de alta salinidad. La determinación de las características culturales de los actinomicetos es importante en la evaluación de la diversidad de la comunidad microbiana cultivable, estos se pueden diferenciar en función de la textura, color, forma y elevación de las colonias, entre otros (Rathore *et al.*, 2019). Los resultados morfológicos obtenidos en este experimento, respecto al tipo de micelio y a la coloración, son similares a los reportados por Goudjal *et al.* (2014), quienes obtuvieron aislados de coloración desde blanco amarillento a gris parduzco. El gen ARNr 16s se encuentra en los organismos procariotas y arqueobacterias, y existe su homólogo eucariota, su tamaño es 1500 pb y presenta un alto grado de conservación para distinguir entre taxones, incluso en niveles taxonómicos profundos (Clarridge, 2004). Según la morfología de la colonia y la secuencia del gen ARNr 16s, el aislado A20, se identificó como *Streptomyces griseoflavus*, A19 como *Streptomyces sp.*, A15 y A18 como *Nocardiopsis lucentensis*.

8.3 Mecanismos de acción de actinomicetos marinos

El uso excesivo de fungicidas sintéticos para controlar hongos fitopatógenos, como *F. solanni*, conduce al desarrollo de resistencia en los fitopatógenos, a la contaminación del suelo y del agua (Fang *et al.*, 2016), el empleo de nuevas alternativas amigables con el medio ambiente

permitirá reducir su uso. Los actinomicetos aislados de ambientes terrestres han sido ampliamente estudiados y caracterizados como agentes de biocontrol contra los fitopatógenos (Benhadj *et al.*, 2019). Por lo tanto, el aislamiento de actinomicetos de ambientes poco investigado como marinos, glacial, salinos, entre otros, permitirá caracterizar nuevos agentes de biocontrol que puedan aplicarse en la agricultura (Gong *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020). El ensayo de doble cultivo se ha utilizado para evaluar la actividad antagonista de los actinomicetos contra hongos fitopatógenos *in vitro* (Awla *et al.*, 2017). En este estudio, solo 4 aislados de los 30 evaluados, mostraron actividad antagonista contra *F. solani*.

Las pruebas de antagonismo *in vitro* son las estrategias más eficientes para la detección de un nuevo microorganismo como agente de biocontrol y desarrollo de productos comerciales (Awla *et al.*, 2017). Diversas especies de *Streptomyces* han sido utilizadas para controlar los hongos fitopatógenos (Ling *et al.*, 2020). Dentro de los compuestos bioactivo que producen destacan las enzimas hidrolíticas y actinomicinas, las cuales, son antibióticos pertenecientes a la familia de las lactonas cromopéptidas que funciona como inhibidora del crecimiento de los fitopatógenos (Zamoum *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2020). Especies de *Nocardiosis* presentan actividad antifúngica frente especies de *Fusarium* y producen diversos metabolitos antimicrobianos hacia diversos fitopatógenos (Intra *et al.*, 2011). Resultados en correspondencia a los obtenidos en este trabajo fueron reportados por Meena *et al.* (2022), *Streptomyces* sp. de origen terrestre redujo el crecimiento micelial de *R. bataticola* en un 65.3%.

Resultados similares obtuvieron Vijayabharathi *et al.* (2018) con *Streptomyces* sp. aislado de ambiente terrestre, redujo el crecimiento micelial de *Botrytis cinérea* en un 77%. Los actinomicetos endófitos, de ambientes marinos y humedales, también han demostrado que inhiben crecimiento de los hongos fitopatógenos en condiciones *in vitro*. Un estudio de *S. polychromogenes* endófito de raíz de palmera datilera inhibió el crecimiento micelial de *F. solani*, la actividad antifúngica *in vitro* estaba asociada con la producción de enzimas líticas que degradan la pared celular (Alblooshi *et al.*, 2022). Extracto de *Streptomyces* sp. de origen marino que contiene oligomycin A inhibió el crecimiento de hifas de *Pyricularia oryzae* en un 83%, además, daño la membrana fúngica, inhibió la germinación de conidios y la formación de apresorios (Buatong *et al.*, 2019). También, se ha demostrado que *Streptomyces* spp. de

ambientes marinos inhibieron el crecimiento de *P. digitatum*, *A. niger* y *F. solani* en 92, 73 y 72% respectivamente (Uba *et al.*, 2019).

La actividad antagonista de los actinomicetos contra los fitopatógenos depende de su capacidad para producir diversos mecanismos antagónicos como; producción de enzimas líticas, metabolitos antifúngicos, competencia por nutrientes, sideróforos, compuestos volátiles, entre otros (Igarashi *et al.*, 2021).

En respuesta a la privación de hierro, los microorganismos liberan en el medio ambiente compuestos quelantes de hierro férrico de alta afinidad llamados sideróforos. Estos sideróforos transportan el Fe^{3+} a la célula microbiana (Ghosh *et al.*, 2020). En nuestro estudio, todos los actinomicetos producen sideróforos, mostrando halos amarillos o anaranjados alrededor de las colonias de las cepas en agar azul. Los sideróforos producidos por los actinomicetos mediaron la actividad antifúngica hacia *F. solani* y esta disminuyó después de agregar hierro al medio de cultivo. Esto podría deberse a que los actinomicetos compitieron por el hierro con el fitopatógeno al secretar sideróforos para suprimir su crecimiento. Resultados similares, en condiciones de deficiencia de hierro o ricas en hierro, demostraron que la aplicación de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al medio tuvieron un efecto negativo sobre el antagonismo de *F. oxysporum f. sp. cubense* por la cepa de actinomiceto *S. sichuanensis*, por el contrario, la actividad antagónica de *S. sichuanensis* se potenció junto con el aumento de la concentración de EDTA-Na_2 , sus extractos indujeron la apoptosis de las células del fitopatógeno (Qi *et al.*, 2022).

Especies de *Streptomyces* han demostrado la capacidad de producir sideróforos y su importancia en el biocontrol de los fitopatógenos (Zhou *et al.*, 2022). Allali *et al.*, 2019 demostraron que especies de *N. dassonvillei* inhibieron el crecimiento de los fitopatógenos *R. solani*, *F. graminearum* y *F. oxysporum* en condiciones *in vitro*, este efecto puede estar relacionado a la producción de sideróforos por el antagonista. *S. rameus* presentó actividad antifúngica hacia *R. bataticola*, esta actividad antifúngica estaba relacionada por la producción de sideróforos, la competencia por el hierro es un mecanismo para inhibir el crecimiento de fitopatógenos (Meena *et al.*, 2022). Resultados similares reportaron Al-Dhabi *et al.* (2019) especies de *Streptomyces* produjeron sideróforos, estos presentaron el potencial de inhibir el crecimiento de los fitopatógenos *F. oxysporum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, y *F. solani*.

Se ha demostrado la capacidad de los actinomicetos de producir COVs que presentan actividad antifúngica hacia los hongos fitopatógenos, estos COVs causan alteraciones estructurales en la célula de los fitopatógenos (Gong *et al.*, 2022). Algunos COVs, como el disulfuro de dimetilo (DMDS) y el 2-metil-pentanoato, son altamente tóxicos para los fitopatógenos de las plantas (Ossowicki *et al.*, 2017), además, COVs como la acetoína, el 2,3-butanodiol y el tridecano, inducen resistencia sistémica en las plantas. Solamente los actinomicetos (A19 y A18) de origen marino produjeron COVs con actividad antifúngica hacia *F. solani*, el actinomiceto ED48 de origen terrestre no produjo COVs. Resultados similares a los reportados en este trabajo, respecto a la inhibición de crecimiento de *F. solani* por COVs, fueron obtenidos por Yang *et al.* (2021), demostraron que COVs de *S. aureoverticillatus* inhibió el crecimiento micelial de *F. oxysporum* en un 63.11%, los COVs identificados que mayor actividad antifúngica presentaron fueron acridina y 9-metil.

También, COVs de *Streptomyces* sp. inhibieron el crecimiento micelial de *R. solani* en un 95%, *F. solani* en un 69% y *F. oxysporum* en un 20 %, además, en condiciones *in vivo* realizado en fresas inoculadas con *B. cinérea*, los COVs inhibieron el desarrollo de síntomas de moho gris en las frutas en más del 87 % en comparación con las fresas de control no tratadas (Ayed *et al.*, 2021). También, se ha demostrado que los VOCs de *Streptomyces* sp. reducen el crecimiento micelial de *C. acutatum* en un 77% (Jepsen *et al.*, 2022). Los COVs, producidos por *S. lavendulae* inhibieron el crecimiento micelial y la esporulación de *Ceratocystis fimbriata* en condiciones *in vitro* y también indujeron cambios morfológicos en las hifas, en un experimento de patogenicidad *in vivo*, *S. lavendulae* disminuyó significativamente el diámetro de la lesión y la tasa de pérdida de agua en raíces tuberosas de papa inoculadas con *C. fimbriata* (Li *et al.*, 2020). Los COV de la cepa *Streptomyces* sp. inhibe fitopatógenos de plantas, incluidos los fitopatógenos de la enfermedad del tizón temprano del tomate *A. solani* (Gong *et al.*, 2020).

8.4 Actividad antifúngica *in vitro* de quitosano hacia *F. solani*

En este estudio, se observó que los tratamientos de quitosano presentan actividad antifúngica hacia *F. solani*, como lo confirmaron sus efectos sobre la biomasa fúngica y el crecimiento micelial. El tratamiento T3 de quitosano presentó mayor actividad antifúngica que la aplicación del fungicida sintético, por lo que es una opción para reducir su aplicación. El mecanismo

antifúngico de los quitosanos involucra la capacidad de interactuar con componentes de la superficie de carga negativa de los hongos fitopatógenos, lo que da como resultado una alteración de la permeabilidad de la membrana y la promoción del desequilibrio osmótico interno. Además, la inhibición de la síntesis de ARNm y proteínas en la célula fúngica resultante de la entrada de quitosano (Ma *et al.*, 2017). Los análisis de microscopía electrónica de barrido mostraron los daños provocados a nivel ultracelular de quitosano hacia *F. solani*, ocasionando alteraciones de la membrana celular y provocando una lisis celular. La inhibición del crecimiento micelial fue consistente con los resultados de un estudio realizado por Loron *et al.* (2023), en este estudio el quitosano disminuyó la producción de micotoxinas por parte de *F. graminearum* lo que provocó una tasa de inhibición del 70%.

Similares resultados se obtuvieron con la aplicación de quitosano de bajo peso molecular (102 kDa) inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de esporas de *F. graminearum* respecto al tratamiento control (Luan *et al.*, 2022). Resultados acordes a los reportados en este trabajo, fueron obtenidos con la aplicación de quitosano (4.0 g L⁻¹) disminuyó significativamente el crecimiento micelial en de *F. oxysporum*, *F. sambucinum* y *F. graminearum* en un 88.4, 89.0 y 89.8% respectivamente en condiciones *in vitro*, demostrando que el quitosano es una alternativa a los fungicidas sintéticos para el control de la pudrición seca de los tubérculos y el marchitamiento por *Fusarium* (Mejdoub-Trabelsi *et al.*, 2020). También, la aplicación de quitosano inhibió el crecimiento del micelio y la germinación de esporas de *F. oxysporum* y la patogenicidad de *F. oxysporum* se redujo después de tratarse con quitosano (Ren *et al.*, 2021). Resultados similares obtuvieron Shagdarova *et al.* (2021), la aplicación de quitosano inhibió el crecimiento micelial de *A. solani*, *F. solani* y *R. solani* en condiciones *in vitro*.

8.5 Biocontrol de actinomicetos marinos y quitosano hacia *F. solani* en tomate

Los actinomicetos aislados de ambientes terrestre han sido reportados como agentes de biocontrol potenciales contra fitopatógenos transmitidos por el suelo durante los últimos años (Boukaew *et al.*, 2022). Sin embargo, el uso de actinomicetos aislados de ambientes marinos como agentes de biocontrol y su efecto en condiciones *in vivo*, ha sido poco explorado.

En este trabajo el actinomiceto marino A19 mostró la mayor reducción de la enfermedad de *F. solani*, e incidencia de la enfermedad respecto al actinomiceto terrestre ED48 y al fungicida sintético, así como los mayores valores en las variables de crecimiento, demostrando su potencial como agente de biocontrol.

Nuestros resultados están en concordancia con los informados por Qi *et al.* (2022), demostraron en un experimento *in vivo* que la cepa *S. sichuanensis* inhibía significativamente la infección de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en las raíces y bulbos de plántulas de banano, respecto al tratamiento control (sin aplicación de actinomicetos) y reduce el índice de enfermedad en un 25.83%. De manera similar, en un experimento en macetas con plántulas de arroz, cepas de *S. chilikensis* redujeron la gravedad de la enfermedad ocasionada por *F. oxysporum* en un 80.51%. Los parámetros de crecimiento de las plantas (longitud de la raíz, peso fresco de la raíz y peso seco de la raíz) también aumentaron en un 53.91, 62.5 y 73.46%, respectivamente, en los grupos de plantas tratadas con *S. chilikensis* en comparación con las infectadas con *F. oxysporum* (Behera *et al.*, 2022).

Por otro lado, nuestros resultados también están en correspondencia con los reportados por Korayem *et al.* (2020) quien evaluó la actividad biológica de la cepa *S. parvulus* contra *R. solani* en judías verdes, estos autores demostraron que las plantas de semillero tratadas con una suspensión de esporas de *S. parvulus* mostraron la tasa de supervivencia más alta (88%) y la más baja (28%), mostrando diferencias significativas con las plantas tratados con fungicidas sintéticos, además, las variables de crecimiento como, altura de la planta, número de hojas y el peso seco de las plantas, aumentaron con el tratamiento con *S. parvulus*, respecto al control y al fungicida sintético.

Se ha demostrado que especies de *Streptomyces* de ambientes terrestre reducen significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea* en plantas de garbanzo en un 47% respecto al control, además, inducen resistencia en la planta huésped a través de enzimas antioxidantes y compuestos fenólicos (Vijayabharathi *et al.*, 2018).

También, actinomicetos endófitos de palmera datilera disminuyó la enfermedad del sudden decline syndrome (SDS) ocasionada por *F. solani* en un 86% en condiciones de invernadero, estos efectos están relacionados a la producción de metabolitos antifúngicos de la cepa de *S. coeruleoprunus* (Alblooshi et al., 2022). Estudios de extractos de *Streptomyces* sp. de ambientes marinos demostraron que disminuyó significativamente el índice de enfermedad de *F. oxyspoum* en un 80%, este efecto podría estar asociado a los metabolitos secundarios ocasionaron la pérdida del equilibrio osmótico, la ruptura de la membrana celular y la fuga de componentes celulares de *F. oxyspoum* (Li et al., 2021b).

De igual forma, la aplicación de *S. vinaceusdrappus* de ambiente marino en plantas de tomate mostro una reducción de la enfermedad (71%) de la pudrición de la raíz ocasionada por *R. solani* en comparación con el control no tratado (Yandigeri et al., 2015). En hojas de tomate desprendidas, la coinoculación de *A. solani* con extracto de *S. puniceus* de ambientes de humedales redujo la enfermedad en 98% en relación con el control, debido a la presencia de metabolitos antifúngicos como la *Alteramide A*. (Hao et al., 2019). Estas investigaciones confirman el potencial de los actinomicetos aislados de diferentes ambientes, no solo el terrestre, como agentes de biocontrol.

También, se han demostrados resultados similares a los obtenidos en este trabajo con la aplicación de quitosano como agente de biocontrol, Massoud et al. (2020) demostraron que el quitosano (4 g L^{-1}) presenta actividad biocontrol hacia la enfermedad del marchitamiento de la fresa por *F. oxysporum*, la aplicación de quitosano mostró significativamente los mayores pesos frescos, secos y longitud de raíces de las plantas y los menores porcentajes de incidencia y severidad de la enfermedad en comparación con el control sin tratar y el fungicida sintético. En correspondencia a nuestros resultados, la aplicación de quitosano (4 g L^{-1}) redujo la severidad de la pudrición en tubérculos de papa inducida por *F. oxysporum* y *F. sambucinum* en 60 y 48.2%, respectivamente. Cuando se probó como tratamiento de plantas, las plantas de papa inoculadas con las especies de *Fusarium* exhibieron 33.5–45.3% menos severidad de marchitamiento en comparación con el control (Mejdoub-Trabelsi et al., 2020).

También, la aplicación de quitosano redujo la incidencia de la enfermedad del marchitamiento bacteriano en plantas de tomate ocasionado por *Ralstonia solanacearum* en un 34.95% y la gravedad de la enfermedad se redujo en un 23.66% (Kemboi et al., 2022).

En este trabajo la combinación de actinomicetos en suelo y quitosano como aspersion foliar, mostraron los mejores resultados respecto a la SE, DI y los parámetros de crecimiento de plantas de tomate infestadas con *F. solani*, que cuando se aplicaron de forma independiente. Sin embargo, existió diferencias significativas entre la combinación de actinomiceto marino más quitosano (A19+Q) y el actinomiceto de origen terrestre más quitosano (ED48+Q), obteniéndose los mejores resultados con el A19Q. Los estudios de actinomicetos marinos se han centrado en condiciones *in vitro*, por lo tanto, existe pocos trabajos de su estudio bajo condiciones *in vivo*. Además, este es el primer trabajo reportado de actinomicetos marinos y quitosano como agentes de biocontrol de *F. solani* en plantas de tomate.

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 30 actinomicetos marinos, de los cuales *Streptomyces* sp., *S. griseoflavus* y *Nocardioopsis lucentensis* presentaron actividad antifúngica *in vitro* contra *F. solani*. *Streptomyces* sp. mostró la mayor actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno con un PICR del 72%. Los cuatros aislados produjeron sideróforos, el aislado A19 mostró la mayor inhibición de *F. solani* por competencia de hierro. Solamente dos aislados inhibieron al fitopatógeno mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles, el A19 presentó el mayor PICR con 76.75%. Todos los tratamientos de actinomicetos produjeron sideróforos e inhibieron el crecimiento micelial de *F. solani* mediante la competencia por hierro en los medios de cultivo. De los tratamientos *in vitro* de quitosano, el tratamiento T3 mostró el mayor PICR hacia *F. solani* con un 81.43%. El A19 de origen marino mostró la mayor reducción de la enfermedad ocasionada por *F. solani*, en comparación con el ED48 de origen terrestre, sin embargo, ambos presentaron mayor reducción SE, DI y aumento en variables de crecimiento que el tratamiento del fungicida sintético. La combinación de actinomicetos y quitosano mejoraron las repuestas de defensa de las plantas de tomate a los daños ocasionados por *F. solani*. El tratamiento de actinomiceto marino más quitosano (A19+Q) mostró diferencias significativas con el resto de los tratamientos en las variables de crecimiento, SE y DI. Por lo tanto, los ambientes marinos son una fuente potencial de aislamiento de microorganismos como agentes de biocontrol contra los fitopatógenos. Los actinomicetos (A19 marino) y (ED48 terrestre) y quitosano son potenciales agentes de biocontrol de *F. solani*.

10. LITERATURA CITADA

- AbdElgawad, H., Abuelsoud, W., Madany, M. M., Selim, S., Zinta, G., Mousa, A. S. y Hozzein, W. N. (2020). Actinomycetes enrich soil rhizosphere and improve seed quality as well as productivity of legumes by boosting nitrogen availability and metabolism. *Biomolecules*, 10(12): 1675. <https://doi.org/10.3390/biom10121675>
- Acquaah, G. (2008). Horticulture: principles and practices. Pearson Education, Inc. 4th ed. New Jersey., 760p.
- Ahsan, S.M., Thomas, M., Reddy, K.K., Sooraparaju, S.G., Asthana, A. y Bhatnagar, I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110: 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>
- Aili, D., Adour, L., Houali, K. y Amrane, A. (2019). Effect of temperature in chitin and chitosan production by solid culture of *Penicillium Camembertii* on YPG medium. *International journal of Biological Macromolecules*, 133: 998–1007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.116>
- Akbar, K., Abbasi, F.M., Sajid, M., Ahmad, M., Khan, Z.U. y Ali, H. (2016). Marker-assisted selection and pyramiding of I1 and Ph3 genes for multiple disease resistance in tomato through PCR analysis. *International Journal of Biosciences*, 9(3): 108–113.
- Alblooshi, A.A., Purayil, G.P., Saeed, E.E., Ramadan, G.A., Tariq, S., Altaee, A.S., El-Tarabily, K.A. y AbuQamar, S.F. (2022). Biocontrol potential of endophytic actinobacteria against *Fusarium solani*, the causal agent of sudden decline syndrome on date palm in the UAE. *Journal of Fungi*, 8(1): 8.
- Al-Dhabi, N.A., Esmail, G.A., Mohammed Ghilan, A.K. y Valan Arasu, M. (2019). Composting of vegetable waste using microbial consortium and biocontrol efficacy of *Streptomyces* Sp. Al-Dhabi 30 isolated from the Saudi Arabian environment for sustainable agriculture. *Sustainability*, 11(23): 6845. <https://doi.org/10.3390/su11236845>
- Al-Fadhal, F.A., AL-Abedy, A.N. y Alkhafije, D.A. (2019). Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Allali, K., Goudjal, Y., Zamoum, M., Bouznada, K., Sabaou, N. y Zitouni, A. (2019). *Nocardiosis dasonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Plant Pathology*, 101(4): 1115-1125. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00347-x>
- Ameen, F., AlNadhari, S. y Al-Homaidan, A.A. (2021). Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1): 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>
- Aranaz, I., Acosta, N., Civera, C., Elorza, B., Mingo, J., Castro, C. y Heras Caballero, A. (2018). Cosmetics and cosmeceutical applications of chitin, chitosan and their derivatives. *Polymers*, 10(2): 213. <https://doi.org/10.3390/polym10020213>
- Avdiushko, S.A., Ye, X.S. y Kuc, J. (1993). Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(6): 441-454. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1993.1033>

- Awla, H.K., Kadir, J., Othman, R., Rashid, T.S., Hamid, S. y Wong, M.Y. (2017). Plant growth-promoting abilities and biocontrol efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae*. *Biological Control*, 112: 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.011>
- Ayed, A., Kalai-Grami, L., Ben Slimene, I., Chaouachi, M., Mankai, H., Karkouch, I. y Limam, F. (2021). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces* sp. strain S97 against *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science and Technology*, 31(12): 1330-1348. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1947982>
- Azadeh, B.F., Sariah, M. y Wong, M.Y. (2010). Characterization of *Burkholderia cepacia* genomovar I as a potential biocontrol agent of *Ganoderma boninense* in oil palm. *African Journal of Biotechnology*, 9(24): 3542-3548.
- Backhouse, D. (2014). Global distribution of *Fusarium graminearum*, *F. asiaticum* and *F. boothii* from wheat in relation to climate. *European Journal of Plant Pathology*, 139(1): 161–173. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0374-5>
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.P., Clément, C., Ouhdouch, Y. y van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1): 1–43. <https://doi.org/10.1128/mmr.00019-15>
- Behera, H.T., Mojumdar, A., Behera, S.S., Das, S. y Ray, L. (2022). Biocontrol of wilt disease of rice seedlings incited by *Fusarium oxysporum* through soil application of *Streptomyces chilikensis* RC1830. *Letters in Applied Microbiology*, 75(5): 1366-1382. <https://doi.org/10.1111/lam.13807>
- Benhadj, M., Gacemi-Kirane, D., Menasria, T., Guebla, K. y Ahmane, Z. (2019). Screening of rare actinomycetes isolated from natural wetland ecosystem (Fetzara Lake, northeastern Algeria) for hydrolytic enzymes and antimicrobial activities. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4): 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.03.008>
- Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology advances*, 32(1), 170-189. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.003>
- Bigéard, J., Colcombet, J. y Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8: 521-539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Boukaew, S., Yossan, S., Cheirsilp, B. y Prasertsan, P. (2022). Impact of environmental factors on *Streptomyces* spp. metabolites against *Botrytis cinerea*. *Journal of Basic Microbiology*, 62(5): 611–622, doi:10.1002/jobm.202100423.
- Bradshaw, M.J., Bartholomew, H.P., Hendricks, D., Maust, A. y Jurick, W.M. (2021). An analysis of postharvest fungal pathogens reveals temporal–spatial and host–pathogen associations with fungicide resistance-related mutations. *Phytopathology*®, 111(11): 1942-1951. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-21-0119-R>
- Buatong, J., Rukachaisirikul, V., Sangkanu, S., Surup, F. y Phongpaichit, S. (2019). Antifungal metabolites from marine-derived *Streptomyces* sp. AMA49 against *Pyricularia oryzae*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13: 653-665. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.2.02>
- Butler, A. y Theisen, R.M. (2010). Iron (III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(3-4): 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.010>
- Cabrera, R., García-López, H., Aguirre-von-Wobeser, E., Orozco-Avitia, J.A. y Gutiérrez-Saldaña, A.H. (2020). *Amycolatopsis* BX17: An actinobacterial strain isolated from soil of a traditional

- milpa agroecosystem with potential biocontrol against *Fusarium graminearum*. *Biological Control*, 147: 104285. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104285>
- Campos, M.D., Félix, M.D.R., Patanita, M., Materatski, P., Albuquerque, A., Ribeiro, J.A. y Varanda, C. (2022). Defense strategies: The role of transcription factors in tomato–pathogen interaction. *Biology*, 11(2): 235.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J.J., Chiquito-Contreras, R.G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C.R. y Hernandez-Montiel, L.G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: a review. *Agronomy*, 9(3): 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>
- Carvalho, R.F., Campos, M.L., Pino, L.E., Crestana, S.L., Zsögön, A., Lima, J.E., Benedito, V.A. y Peres, L.E. (2011). Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 7(1): 18. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-18>
- Cech, R., Zaller, J.G., Lyssimachou, A., Clausing, P., Hertoge, K. y Linhart, C. (2023). Pesticide drift mitigation measures appear to reduce contamination of non-agricultural areas, but hazards to humans and the environment remain. *Science of The Total Environment*, 854: 158814. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158814>
- Chamarro, J. (1995). Anatomía y fisiología de la planta. En: Nuez, F. (ed.). El cultivo del tomate. Mundi Prensa. Madrid. (pp. 43–91).
- Chang, X., Dai, H., Wang, D., Zhou, H., He, W., Fu, Y., Ibrahim, F., Zhou, Y., Gong, G., Shang, J., Yang, J., Wu, X., Yong, T., Song, C. y Yang, W. (2018). Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 151(3): 563-577. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1410-7>
- Cheba, B.A. (2011). Chitin and chitosan: marine biopolymers with unique properties and versatile applications. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(3): 149-153.
- Chen, Z., Ou, P., Liu, L. y Jin, X. (2020). Anti-MRSA activity of actinomycin X2 and collismycin A produced by *Streptomyces globisporus* WA5-2-37 from the intestinal tract of American cockroach (*Periplaneta americana*). *Frontiers in Microbiology*, 11: 555. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00555>
- Cheng, G., Liu, F., Huang, Y., Yang, H., Yao, J., Shen, H. y Xu, J. (2014). Colonization of *Streptomyces felleus* YJ1 and its effects on disease resistant-related enzymes of oilseed rape. *Journal of Agricultural Science*, 6(5): 26. <https://doi.org/10.5539/jas.v6n5p26>
- Chun, S.C. y Chandrasekaran, M. (2019). Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125: 948-954. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.167>
- Clarridge, J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4): 840-862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- CONABIO (2022). Superficies de manglares en México. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/monitoreo/smmm/extensionDist>
- Cook, D.E., Mesarich, C.H. y Thomma, B.P.H.J. (2015). Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1): 541-563. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>

- Cruz, A.F., Silva, L.F., Sousa, T.V., Nicoli, A., de Paula Junior, T.J., Caixeta, E.T. y Zambolim, L. (2018). Molecular diversity in *Fusarium oxysporum* isolates from common bean fields in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 152(2): 343-354. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1479-7>
- Das, S.C., Thammineni, P. y Ashton, E.C. (2022). Mangroves: A unique ecosystem and its significance. In mangroves: Biodiversity, livelihoods and conservation (pp. 3-11). Springer, Singapore.
- de Lamo, F.J., Šimkovicová, M., Fresno, D.H., de Groot, T., Tintor, N., Rep, M. y Takken, F.L. (2020). Pattern-triggered immunity restricts host colonization by endophytic fusaria, but does not affect endophyte-mediated resistance. *Molecular Plant Pathology*, 00: 1-12. <https://doi.org/10.1111/mpp.13018>
- del Rosario Cappellari, L., Chiappero, J. y Banchio, E. (2019). Invisible signals from the underground: A practical method to investigate the effect of microbial volatile organic compounds emitted by rhizobacteria on plant growth. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 47(4): 388-393. <https://doi.org/10.1002/bmb.21243>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. y Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Deshaies, M., Lamari, N., Ng, C.K., Ward, P. y Doohan, F.M. (2022). The impact of chitosan on the early metabolomic response of wheat to infection by *Fusarium graminearum*. *BMC plant biology*, 22(1): 1-17.
- Di, X., Takken, F.L.W. y Tintor, N. (2016). How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 170. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00170>
- Díaz-Díaz, M., Bernal-Cabrera, A., Trapero, A., Medina-Marrero, R., Sifontes-Rodríguez, S., Cupull-Santana, R.D. y Agustí-Brisach, C. (2022). Characterization of actinobacterial strains as potential biocontrol agents against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*, the main soil-borne pathogens of phaseolus vulgaris in Cuba. *Plants*, 11(5): 645. <https://doi.org/10.3390/plants11050645>
- Divya, K., Vijayan, S., George, T.K. y Jisha, M.S. (2017). Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: mode of action and factors affecting activity. *Fibers and Polymers*, 18(2): 221-230.
- Djebaili, R., Pellegrini, M., Ercole, C., Farda, B., Kitouni, M. y Del Gallo, M. (2021). Biocontrol of soil-borne pathogens of *Solanum lycopersicum* L. and *Daucus carota* L. by plant growth-promoting actinomycetes: In vitro and in planta antagonistic activity. *Pathogens*, 10(10): 1305.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I. A., Ayliffe, M.A., Kobe, B. y Ellis, J.G. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23): 8888–8893. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602577103>
- Duarte Leal, Y., Echevarría Hernández, A. y Martínez Coca, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 31(3): 173-183.

- Duraipandiyam, V., Sasi, A.H., Islam, V.I.H., Valanarasu, M. y Ignacimuthu, S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *Journal de Mycologie Medicale*, 20(1): 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2009.11.002>
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- El Amerany, F., Meddich, A., Wahbi, S., Porzel, A., Taourirte, M., Rhazi, M. y Hause, B. (2020). Foliar application of chitosan increases tomato growth and influences mycorrhization and expression of endochitinase-encoding genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2): 535. <https://doi.org/10.3390/ijms21020535>
- Escobar, H. y Lee, R. (2010). Manual de producción de tomate bajo invernadero. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Cuadernos del Centro de Investigaciones y Asesorías Agroindustriales-CIAA, Bogotá.
- Fadhilah, Q.G., Santoso, I., Maryanto, A.E., Abdullah, S. y Yasman, Y. (2021). Evaluation of the antifungal activity of marine actinomycetes isolates against the phytopathogenic fungi *Colletotrichum siamense* KA: a preliminary study for new antifungal compound discovery. *Pharmacia*, 68: 837-843.
- Fadji, A.E. y Babalola, O.O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8: 467. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>
- Fang, H., Han, L., Cui, Y., Xue, Y., Cai, L. y Yu, Y. (2016). Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments. *Science of the Total Environment*, 572: 1203-1212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.038>
- FAO (2018). Post-harvest management of tomato for quality and safety assurance Guidance for horticultural supply chain stakeholders. FAO, Rome.
- FAOSTAT (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://fao.org/faostat/en>.
- Fikri, M.R.A., Sam'un, M., Lestari, Z.A., Rahmawati, T.D. y Triadi, T. (2022). Utilization of mangrove forest as alternative income for coastal communities in Sukakarta Village, Karawang. *ABDIMAS: Jurnal Pengabdian Masyarakat*, 5(1): 2075-2080.
- FIRA (2019). Panorama Agroalimentario. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). México. 59.
- Fournier, P., Szczepanski, C.R., Godeau, R.P. y Godeau, G (2020). Chitosan extraction from *Goliathus orientalis* Moser, 1909: Characterization and comparison with commercially available chitosan. *Biomimetics*, 5(2): 15. <https://doi.org/10.3390/biomimetics5020015>
- Gai, Q.Y., Jiao, J., Wang, X., Liu, J., Wang, Z.Y. y Fu, Y.J. (2019). Chitosan promoting formononetin and calycosin accumulation in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures via mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Scientific Reports*, 9(1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46820-6>
- Gebily, D.A., Ghanem, G.A., Ragab, M.M., Ali, A.M., Soliman, N.E.D.K. y Abd El-Moity, T.H. (2021). Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de bary infecting green bean. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(33): 1-15. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00373-x>

- Ghosh, S.K., Bera, T. y Chakrabarty, A.M. (2020). Microbial siderophore—A boon to agricultural sciences. *Biological Control*, 144: 104214. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>
- Gong, B., Chen, S., Lan, W., Huang, Y. y Zhu, X. (2018). Antibacterial and antitumor potential of actinomycetes isolated from mangrove soil in the Maowei sea of the southern coast of China. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(4): 1339-1346. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2018.2280>
- Gong, Y., Chen, L. J., Pan, S. Y., Li, X. W., Xu, M. J., Zhang, C. M. y Qin, S. (2020). Antifungal potential evaluation and alleviation of salt stress in tomato seedlings by a halotolerant plant growth-promoting actinomycete *Streptomyces* sp. KLBMP5084. *Rhizosphere*, 16, 100262. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100262>
- Gong, Y., Liu, J.Q., Xu, M.J., Zhang, C.M., Gao, J., Li, C.G. y Qin, S. (2022). Antifungal volatile organic compounds from *Streptomyces setonii* WY228 control black spot disease of sweet potato. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(6): e02317-21.
- González-Franco, A.C. y Robles-Hernández, L. (2009). Actinomycetes as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(2): 64-73.
- González-Peña Fundora, D., Falcón-Rodríguez, A.B., Costales Menendez, D., Foroud, N.A., Vaillant Flores, D., Aispuro-Hernández, E. y Martínez-Téllez, M.Á. (2022). Chitosan induces tomato basal resistance against *Phytophthora nicotianae* and inhibits pathogen development. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 44(3): 400-414.
- Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Davenport, R., Chun, J. y Curtis, T. (1998). Activated sludge foaming: the true extent of actinomycete diversity. *Water Science and Technology*, 37(4-5): 511-519. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00153-X)
- Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F. y Zitouni, A. (2014). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 169(1): 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.014>
- Grandini, A., Summa, D., Costa, S., Buzzi, R., Tamburini, E., Sacchetti, G. y Guerrini, A. (2022). Biotransformation of waste bile acids: A new possible sustainable approach to anti-fungal molecules for crop plant bioprotection? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8): 4152.
- Hahn, T., Tafi, E., von Seggern, N., Falabella, P., Salvia, R., Thomä, J. y Zibek, S. (2022). Purification of chitin from pupal exuviae of the black soldier fly. *Waste and Biomass Valorization*, 13(4): 1993-2008.
- Hamdi, M., Hammami, A., Hajji, S., Jridi, M., Nasri, M. y Nasri, R. (2017). Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101: 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.103>
- Hamed, I., Özogul, F. y Regenstein, J.M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): a review. *Trends in Food Science and Technology*, 48: 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
- Hao, L., Zheng, X., Wang, Y., Li, S., Shang, C. y Xu, Y. (2019). Inhibition of tomato early blight disease by culture extracts of a *Streptomyces puniceus* isolate from mangrove soil. *Phytopathology*, 109(7): 1149-1156. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0444-R>

- He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alvindia, D.G. y Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens*, 10(10): 1311. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101311>
- Hernandez-Montiel, L.G., Gutierrez-Perez, E.D., Murillo-Amador, B., Vero, S., Chiquito-Contreras, R.G. y Rincon-Enriquez, G. (2018). Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 139: 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.015>
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. y Matsui, H (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5): 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Hong, C.E., Jeong, H., Jo, S.H., Jeong, J.C., Kwon, S.Y., An, D. y Park, J.M. (2016). A leaf-inhabiting endophytic bacterium, *Rhodococcus* sp. KB6, enhances sweet potato resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(3): 488-492. <https://doi.org/10.4014/jmb.1511.11039>
- Igarashi, M., Sawa, R., Umekita, M., Hatano, M., Arisaka, R., Hayashi, C., Ishizaki, Y., Suzuki, M. y Kato, C. (2021). Sealutomicins, new enediyne antibiotics from the deep-sea actinomycete *Nonomuraea* sp. MM565M-173N2. *Journal of Antibiotics*, 74(5): 291-299. <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00402-1>
- Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y. y Panbangred, W. (2011). Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. *BMC Research Notes*, 4: 98. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-98>
- Ismaila, A.A., Ahmad, K., Siddique, Y., Wahab, M.A.A., Kutawa, A.B., Abdullahi, A. y Abdullah, S. N.A. (2022). *Fusarium* wilt of banana: Current update and sustainable disease control using classical and essential oils approaches. *Horticultural Plant Journal*, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2022.02.004>
- Jepsen, T., Jensen, B. y Jørgensen, N.O. (2022). Volatiles produced by *Streptomyces* spp. delay rot in apples caused by *Colletotrichum acutatum*. *Current Research in Microbial Sciences*, 3: 100121. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100121>
- Jiang, X., Lin, H., Lin, M., Chen, Y., Wang, H., Lin, Y. y Lin, Y. (2018). A novel chitosan formulation treatment induces disease resistance of harvested litchi fruit to *Peronophythora litchii* in association with ROS metabolism. *Food Chemistry*, 266: 299-308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.010>
- Kaari, M., Joseph, J., Manikkam, R., Sreenivasan, A., Venugopal, G., Alexander, B. y Krishnan, S. (2022). Anti-Biofilm activity and biocontrol potential of *Streptomyces* cultures against *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Indian Journal of Microbiology*, 62: 32-39.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A. y Singh, B. (2015). Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20(1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s40502-015-0139-6>
- Kaur, J., Munshi, G.D., Singh, R.S. y Koch, E. (2005). Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*, 153(5): 274-279. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00969.x>
- Kaya, M. y Baran, T. (2015a). Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 75: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.015>

- Kaya, M., Baublys, V., Šatkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E. y Tubelytė, V. (2015b). First chitin extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79: 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.066>
- Ke, Y., Ding, B., Zhang, M., Dong, T., Fu, Y., Lv, Q. y Wang, X. (2022). Study on inhibitory activity and mechanism of chitosan oligosaccharides on *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus fumigatus*. *Carbohydrate Polymers*, 275: 118673.
- Kemboi, V.J., Kipkoeh, C., Njire, M., Were, S., Lagat, M.K., Ndwiga, F. y Tanga, C.M. (2022). Biocontrol potential of chitin and chitosan extracted from black soldier fly pupal exuviae against bacterial wilt of tomato. *Microorganisms*, 10(1): 165.
- Khan, M.I., An, X., Dai, L., Li, H., Khan, A. y Ni, Y. (2019). Chitosan-based polymer matrix for pharmaceutical excipients and drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 26(14): 2502-2513. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180927100817>
- Köhl, J., Kolnaar, R. y Ravensberg, W.J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10: 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Korayem, A.S., Abdelhafez, A.A., Zaki, M.M. y Saleh, E.A. (2020). Biological control of green bean damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* by *Streptomyces parvulus* strain 10d. *Egyptian Journal of Microbiology*, 55: 87-94.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El hamss, H., Belabess, Z. y Ait Barka, E. (2022). Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms*, 10(3): 596. doi:10.3390/microorganisms10030596
- Lamb, C. y Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1): 251-275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>
- Latz, M.A., Jensen, B., Collinge, D.B. y Jørgensen, H.J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5-6): 555-567. <https://doi.org/10.1080/17550874.2018.1534146>
- Lee, J., Postmaster, A., Soon, H.P., Keast, D. y Carson, K.C. (2012). Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *Biometals*, 25(2): 285-296. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9503-9>
- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. (2008). *The Fusarium Laboratory Manual* - John F. Leslie, Brett A. Summerell. John Wiley and Sons. doi: 10.1002/9780470278376
- Li, H., Wang, Y., Liu, F., Yang, Y., Wu, Z., Cai, H., Zhang, Q., Wang, Y. y Li, P. (2015). Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae*, 186: 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.014>
- Li, K., Xing, R., Liu, S. y Li, P. (2020). Chitin and chitosan fragments responsible for plant elicitor and growth stimulator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(44): 12203-12211.
- Li, R., Liu, B., Xu, W., Yu, L., Zhang, C., Cheng, J. y Zhang, Y. (2022). DNA damage and cell apoptosis induced by fungicide difenoconazole in mouse mononuclear macrophage RAW264.7. *Environmental Toxicology*, 37(3): 650-659.

- Li, W., Ren, L., Li, Q., Zhang, D., Jin, X., Fang, W. y Cao, A. (2023). Evaluation of ethylin as a potential soil fumigant in commercial tomato production in China. *Science of The Total Environment*, 854: 158520. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158520>
- Li, X., Jing, T., Zhou, D., Zhang, M., Qi, D., Zang, X. y Xie, J. (2021a). Biocontrol efficacy and possible mechanism of *Streptomyces* sp. H4 against postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 175: 111401. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111401>
- Li, X., Li, B., Cai, S., Zhang, Y., Xu, M., Zhang, C. y Qin, S. (2020). Identification of rhizospheric actinomycete *Streptomyces lavendulae* sps-33 and the inhibitory effect of its volatile organic compounds against *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Microorganisms*, 8(3): 319. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030319>
- Li, X., Li, K., Zhou, D., Zhang, M., Qi, D., Jing, T. y Xie, J. (2021b). Biological control of banana wilt disease caused by *Fusarium oxyspoum* f. sp. *Cubense* using *Streptomyces* sp. H4. *Biological Control*, 155: 104524. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104524>
- Liénart, Y., Gautier, C. y Domard, A. (1991). Isolation from *Rubus* cell-suspension cultures of a lectin specific for glucosamine oligomers. *Planta*, 184(1): 8-13. <https://doi.org/10.1007/BF00208229>
- Ling, L., Han, X., Li, X., Zhang, X., Wang, H., Zhang, L. y Xiang, W. (2020). A *Streptomyces* sp. NEAU-HV9: Isolation, identification, and potential as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum* of tomato plants. *Microorganisms*, 8(3): 351. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030351>
- Liu, D., Jiao, S., Cheng, G., Li, X., Pei, Z., Pei, Y. y Du, Y. (2018). Identification of chitosan oligosaccharides binding proteins from the plasma membrane of wheat leaf cell. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 1083-1090. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.113>
- Liu, H., Du, Y., Yang, J. y Zhu, H. (2004). Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. *Carbohydrate Polymers*, 55(3): 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.10.001>
- Liu, J., Zhang, X., Kennedy, J.F., Jiang, M., Cai, Q. y Wu, X. (2019). Chitosan induces resistance to tuber rot in stored potato caused by *Alternaria tenuissima*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140: 851-857. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.227>
- Liu, Q., Tian, J.H., Liu, H.C., Zhou, Y.G. y Xin, Y.H. (2020). *Cryobacterium ruanii* sp. nov. and *Cryobacterium breve* sp. nov., isolated from glaciers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3): 1918-1923. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003994>
- Liu, Y., Xu, R., Tian, Y., Wang, H., Ma, F., Liu, C. y Li, C. (2023). Exogenous chitosan enhances the resistance of apple to *Glomerella* leaf spot. *Scientia Horticulturae*, 309: 111611. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111611>
- Lopez-Moya, F., Colom-Valiente, M.F., Martinez-Peinado, P., Martinez-Lopez, J.E., Puellas, E., Sempere-Ortells, J.M. y Lopez-Llorca, L.V. (2015). Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. *Fungal Biology*, 119(2-3): 154-169. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.003>
- Loron, A., Wang, Y., Atanasova, V., Richard-Forget, F., Gardrat, C. y Coma, V. (2023). Chitosan for eco-friendly control of mycotoxinogenic *Fusarium graminearum*. *Food Hydrocolloids*, 134: 108067. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108067>

- Luan, J., Wei, X., Li, Z., Tang, W., Yang, F., Yu, Z. y Li, X. (2022). Inhibition of chitosan with different molecular weights on Barley-Borne *Fusarium graminearum* during Barley Malting process for improving malt quality. *Foods*, 11(19): 3058. <https://doi.org/10.3390/foods11193058>
- Ma, Z., Garrido-Maestu, A. y Jeong, K.C. (2017). Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *In Carbohydrate Polymers*, 176: 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.082>
- Machałowski, T., Wysokowski, M., Tsurkan, M.V., Galli, R., Schimpf, C., Rafaja, D. y Ehrlich, H. (2019). Spider chitin: an ultrafast microwave-assisted method for chitin isolation from *Caribena versicolor* spider molt cuticle. *Molecules*, 24(20): 3736. <https://doi.org/10.3390/molecules24203736>
- Mahmood, Y., Khan, M.A., Javed, N. y Arif, M.J. (2015). Comparative efficacy of fungicides and biological control agents for the management of chickpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(4): 1063-1071.
- Malek, N.A., Chowdhury, A.J.K., Zainuddin, Z. y Abidin, Z.A.Z. (2014). Selective isolation of actinomycetes from mangrove forest of Pahang, Malaysia. *International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences*, (2014): 7-11. <https://doi.org/10.17758/IAAST.A1214007>
- Maluin, F.N. y Hussein, M.Z. (2020). Chitosan-based agronanochemicals as a sustainable alternative in crop protection. *Molecules*, 25(7): 1611. <https://doi.org/10.3390/molecules25071611>
- Marlatt, M.L., Correll, J.C., Kaufmann, P. y Cooper, P.E. (1996). Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease*, 80(12): 1336-1342. <https://doi.org/10.1094/PD-80-1336>
- Massoud, M.A., Kordy, A.M., Abdel-Mageed, A.A., Heflish, A.I.A. y Sehier, M.M. (2020). Impact of chitosan, *Trichoderma harzianum*, thyme oil and jojoba extract against *Fusarium* Wilt disease of strawberry. *Journal of the Advances in Agricultural Researches*, 25(2): 176-196.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E. y Flors, V. (2017). Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1): 485-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Mauro, M., Pinto, P., Settanni, L., Puccio, V., Vazzana, M., Hornsby, B.L. y Arizza, V. (2022). Chitosan film functionalized with grape seed oil-preliminary evaluation of antimicrobial activity. *Sustainability*, 14(9): 5410. <https://doi.org/10.3390/su14095410>
- Meena, L.I., Rajeswari, E., Ahiladevi, P., Kamalakannan, A. y Kalaiselvi, T. (2022). Antifungal potential of *Streptomyces rameus* GgS 48 against mungbean root rot [*Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler]. *Journal of Biosciences*, 47(10): 1-17.
- Meena, M., Swapnil, P., Divyanshu, K., Kumar, S., Tripathi, Y.N., Zehra, A., Marwal, A. y Upadhyay, R. (2020a). PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: current perspectives. *Journal of Basic Microbiology*, 60(10): 828-861. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000370>
- Meena, R.S., Kumar, S., Datta, R., Lal, R., Vijayakumar, V., Brtnicky, M., Sharma, M.P., Yadav, G.S., Jhariya, M.K., Jangir, C.K., Pathan, S.I., Dokulilova, T., Pecina, V. y Marfo, T.D. (2020b). Impact of agrochemicals on soil microbiota and management: a review. *Land*, 9(2): 34. <https://doi.org/10.3390/land9020034>

- Mejdoub-Trabelsi, B., Touihri, S., Ammar, N., Riahi, A. y Daami-Remadi, M. (2020). Effect of chitosan for the control of potato diseases caused by *Fusarium* species. *Journal of Phytopathology*, 168(1): 18-27.
- Mekasha, S., Byman, I.R., Lynch, C., Toupalová, H., Anděra, L., Næs, T. y Eijsink, V.G. (2017). Development of enzyme cocktails for complete saccharification of chitin using mono-component enzymes from *Serratia marcescens*. *Process Biochemistry*, 56, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.021>
- Mitra, D., Mondal, R., Khoshru, B., Senapati, A., Radha, T.K., Mahakur, B. y Das Mohapatra, P.K. (2022). Actinobacteria-enhanced plant growth, nutrient acquisition, and crop protection: advances in soil, plant, and microbial multifactorial interactions. *Pedosphere*, 32(1): 149-170. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60042-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60042-5)
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K. y Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49): 19613-19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>
- Mohan, K., Ganesan, A.R., Ezhilarasi, P.N., Kondamareddy, K.K., Rajan, D.K., Sathishkumar, P. y Conterno, L. (2022). Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119349.
- Murugan, L., Krishnan, N., Venkataravanappa, V., Saha, S., Mishra, A.K., Sharma, B.K. y Rai, A.B. (2020). Molecular characterization and race identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infecting tomato in India. *3 Biotech*, 10: 486. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02475-z>
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R.K., Uppalapati, S.R., Gupta, V.K., Yli-Mattila, T., Clement Tsui, K.M., Srinivas, C., Niranjana, S.R. y Chandra, N.S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*, 6: 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep21367>
- Niyomvong, N., Pathom-Aree, W., Thamchaipenet, A. y Duangmal, K. (2012). Actinomycetes from tropical limestone caves. *Chiang Mai Journal of Science*, 39(3): 373-388.
- Nwe, N., Furuike, T. y Tamura, H. (2009). The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*, 2(2): 374-398. <https://doi.org/10.3390/ma2020374>
- Obianom, C., Romanazzi, G. y Sivakumar, D. (2019). Effects of chitosan treatment on avocado postharvest diseases and expression of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and lipoxygenase genes. *Postharvest Biology and Technology*, 147: 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.004>
- Ochoa, J.L., Hernández-Montiel, L.G., Latisnere-Barragán, H., de La Luz, J.L. y Larralde-Corona, C.P. (2007). Isolation and identification of pathogenic fungi from orange *Citrus sinensis* L. Osbeck cultured in Baja California Sur, México. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(5): 352-359.
- Okubara, P.A., Schroeder, K.L. y Paulitz, T.C. (2005). Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(3): 300-313. <https://doi.org/10.1080/07060660509507229>
- Ossowicki, A., Jafra, S. y Garbeva, P. (2017). The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS one*, 12(3): e0174362.

- Palacios-Torres, R. E., Santos-Chavez, A., Ortega-Ortiz, H., Ramírez-Seañez, A.R., Yam-Tzec, J.A., Amador-Mendoza, A. y Hernández-Hernández, H. (2022). Effect of chitosan-poly (acrylic acid) complexes and two nutrient solutions on the growth and yield of two habanero pepper cultivars. *Horticulturae*, 8(3): 201.
- Palit, K., Rath, S., Chatterjee, S. y Das, S. (2022). Microbial diversity and ecological interactions of microorganisms in the mangrove ecosystem: threats, vulnerability, and adaptations. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-46.
- Palla, M.S., Guntuku, G.S., Muthyala, M.K.K., Pingali, S. y Sahu, P.K. (2018). Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite producing actinomycete from mangrove soil. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(2): 250-256. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.006>
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J.A., Pérez-Berná, A.J., Huang, I.C., Jansson, H.B., Salinas, J., Villalaín, J., Read, N.D. y Lopez-Llorca, L.V. (2010). Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology*, 75(4): 1021-1032. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x>
- Pel, M.J. y Pieterse, C.M. (2013). Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of experimental botany*, 64(5): 1237-1248. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers262>
- Peter, S., Lyczko, N., Gopakumar, D., Maria, H.J., Nzihou, A. y Thomas, S. (2020). Chitin and chitosan based composites for energy and environmental applications: a review. *Waste and Biomass Valorization*, 1-28. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01244-6>
- Philibert, T., Lee, B. y Fabien, N. (2017). Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 181(4): 1314-1337.
- Qi, D., Zou, L., Zhou, D., Zhang, M., Wei, Y., Li, K. y Xie, J. (2022). Biocontrol potential and antifungal mechanism of a novel *Streptomyces sichuanensis* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 *in vitro* and *in vivo*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(4): 1633-1649. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11788-3>
- Qiu, S., Zhou, S., Tan, Y., Feng, J., Bai, Y., He, J. y Su, Z. (2022). Biodegradation and prospect of polysaccharide from crustaceans. *Marine Drugs*, 20(5): 310.
- Quiñones-Aguilar, E.E., Evangelista-Mar, Z. y Rincón-Enríquez, G. (2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos*, 101: 59-64.
- Quitain, R.A. (2022). A comparative assessment on the perceived value of Sukol river mangrove ecosystem by the local policymakers and residents of Bongabong, oriental Mindoro, Philippines utilizing multi criteria evaluation. *Interdisciplinary Journal of Applied and Basic Subjects*, 2(3): 01-06.
- Ramlawi, S., Abusharkh, S., Carroll, A., McMullin, D.R. y Avis, T.J. (2021). Biological and chemical characterization of antimicrobial activity in *Arthrobacter* spp. isolated from disease-suppressive compost. *Journal of Basic Microbiology*, 61(8): 745-756. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100213>
- Rasti, H., Parivar, K., Baharara, J., Iranshahi, M. y Namvar, F. (2017). Chitin from the Mollusc Chiton: Extraction, characterization and chitosan preparation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 16(1): 366-379.
- Rathore, D.S., Sheikh, M., Gohel, S. y Singh, S.P. (2019). Isolation strategies, abundance and characteristics of the marine actinomycetes of Kachhighadi, Gujarat, India. *Journal of the Marine Biological Association of India*, 61(1): 71-78.

- Ren, J., Tong, J., Li, P., Huang, X., Dong, P. y Ren, M. (2021). Chitosan is an effective inhibitor against potato dry rot caused by *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113, 101601. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101601>
- Rocha, M., Coimbra, M. y Nunes, C. (2017). Applications of chitosan and their derivatives in beverages: a critical review. *Current Opinion in Food Science*, 15: 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.008>
- Romanazzi, G., Sanzani, S.M., Bi, Y., Tian, S., Gutiérrez Martínez, P. y Alkan, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.0037>
- Roncero, M.I., Di Pietro, A., Ruiz-Roldán, M.C., Huertas-González, M.D., Garcia-Maceira, F.I., Méglecz, E., Jiménez, A., Caracuel, Z., Sancho-Zapatero, R., Hera, C., Gómez-Gómez, E., Ruiz-Rubio, M., González-Verdejo, C.I. y Páez, M.J. (2000). Role of cell wall-degrading enzymes in pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(1): S47-53.
- Roskova, Z., Skarohlid, R. y McGachy, L. (2022). Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of The Total Environment*, 819: 153144, doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153144
- SAGARPA (2018). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <https://www.gob.mx/agricultura>
- Santos, V.P., Marques, N.S., Maia, P.C., Lima, M.A.B.D., Franco, L.D.O. y Campos-Takaki, G.M.D. (2020). Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12): 4290. <https://doi.org/10.3390/ijms21124290>
- Saravanakumar, K., Yu, C., Dou, K., Wang, M., Li, Y. y Chen, J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Biological Control*, 94: 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.001>
- Sayari, N., Sila, A., Abdelmalek, B.E., Abdallah, R. Ben, Ellouz-Chaabouni, S., Bougatef, A. y Balti, R. (2016). Chitin and chitosan from the *Norway lobster* by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87: 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.057>
- Schelegueda, L.I., Zalazar, A.L., Gliemmo, M.F. y Campos, C.A. (2016). Inhibitory effect and cell damage on bacterial flora of fish caused by chitosan, nisin and sodium lactate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83: 396-402. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.033>
- Schnug, L., Ergon, T., Jakob, L., Scott-Fordsmand, J.J., Joner, E.J. y Leinaas, H.P. (2015). Responses of earthworms to repeated exposure to three biocides applied singly and as a mixture in an agricultural field. *Science of the Total Environment*, 505: 223-235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.089>
- Shagdarova, B.T., Karpova, N.V., Il'ina, A.V. y Varlamov, V.P. (2021). The effect of chitosan hydrolysate on the fungi *Alternaria solani*, *F. solani* and *R. solani* *in vitro*. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 26: 200-209.
- Sharma, S., Fulke, A.B. y Chaubey, A. (2019). Bioprospection of marine actinomycetes: recent advances, challenges and future perspectives. *Acta Oceanologica Sinica*, 38(6): 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13131-018-1340-z>

- Shirling, E.B. y Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3): 313-340.
- Shoresh, M., Harman, G.E. y Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1): 21-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
- Shrestha, B., Nath, D.K., Maharjan, A., Poudel, A., Pradhan, R.N. y Aryal, S. (2021). Isolation and Characterization of Potential Antibiotic-Producing Actinomycetes from Water and Soil Sediments of Different Regions of Nepal. *International Journal of Microbiology*, 2021: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2021/5586165>
- Silva, W.B., Silva, G.M.C., Santana, D.B., Salvador, A.R., Medeiros, D.B., Belghith, I. y Misobutsi, G.P. (2018). Chitosan delays ripening and ROS production in guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Food Chemistry*, 242: 232-238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.052>
- Singh, S.P. y Gaur, R. (2017). Endophytic *Streptomyces* spp. underscore induction of defense regulatory genes and confers resistance against *Sclerotium rolfsii* in chickpea. *Biological Control*, 104: 44-56. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.011>
- Singh, V.K., Singh, H.B. y Upadhyay, R.S. (2017). Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118: 320-332. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.06.028>
- Singha, I.M., Kakoty, Y., Unni, B.G., Das, J. y Kalita, M.C. (2016). Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing *Fusarium* wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1): 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.07.001>
- Sivakumar, T., Balabaskar, P. y Sanjeevkumar, K. (2018). Variability in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing wilt of tomato. *International Journal of Chemical Studies*, 6(2): 3655-3659.
- Soldan, R., Mapelli, F. Crotti, E. Schnell, S. Daffonchio, D. Marasco, R. Fusi, M. Borin, S. y Cardinale, M. (2019). Bacterial endophytes of mangrove propagules elicit early establishment of the natural host and promote growth of cereal crops under salt stress. *Microbiological Research*, 223: 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.008>
- Song, C., Yu, H., Zhang, M., Yang, Y. y Zhang, G. (2013). Physicochemical properties and antioxidant activity of chitosan from the blowfly *Chrysomya megacephala* larvae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60: 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.05.039>
- Spadaro, D. y Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47: 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- Srinivasan, H., Kanayairam, V. y Ravichandran, R. (2018). Chitin and chitosan preparation from shrimp shells *penaeus monodon* and its human ovarian cancer cell line, PA-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107: 662-667. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.035>
- Summerell, B.A., Laurence, M.H., Liew, E.C.Y. y Leslie, J.F. (2010). Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Diversity*, 44: 3-13. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2>

- Summerell, B.A., Salleh, B. y Leslie, J.F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87(2): 117-128. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>
- Sun, C., Fu, D., Jin, L., Chen, M., Zheng, X. y Yu, T. (2018). Chitin isolated from yeast cell wall induces the resistance of tomato fruit to *Botrytis cinerea*. *Carbohydrate Polymers*, 199: 341-352. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.045>
- Talavera, G. y Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4): 564-577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4): 678-687. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
- Taşkın, P., Canisağ, H. y Şen, M. (2014). The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 94: 236-239. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2013.04.007>
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M. y Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, 44(26): 7939-7952. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025>
- Torres-Rodríguez, J.A., Reyes-Pérez, J.J., Castellanos, T., Angulo, C., Quiñones-Aguilar, E.E. y Hernández-Montiel, L.G. (2021). A biopolymer with antimicrobial properties and plant resistance inducer against phytopathogens: Chitosan. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(1): 12231-12231. <https://doi.org/10.15835/NBHA49112231>
- Torres-Rodríguez, J.A., Reyes-Pérez, J.J., Castellanos, T., Angulo, C., Quiñones-Aguilar, E.E. and Hernández-Montiel, L.G. (2022). Identification and morphological characterization of marine actinomycetes as biocontrol agents of *Fusarium solani* in tomato. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 39(1): e223915.
- Torres-Rodríguez, J.A., Reyes-Pérez, J.J., González-Gómez, L.G., Jiménez-Pizarro, M., Boicet-Fabre, T., Enríquez-Acosta, E.A. y González-Rodríguez, J.C. (2018). Respuesta agronómica de dos variedades de maíz blanco (*Zea mays*, L.) a la aplicación de QuitoMax, Azofert y Ecomic. *Biotecnia*, 20(1): 3-7. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v20i1.522>
- Uba, B.O., Okoye, E.B., Anyaeji, O.J. y Ogbonnaya, O.C. (2019). Antagonistic potentials of actinomycetes isolated from coastal area of Niger Delta against *Citrus sinensis* (Sweet Orange) and *Lycopersicon esculentum* (Tomato) fungal pathogens. *Research & Reviews: A Journal of Biotechnology*, 9: 4-15.
- Uragami, T., Saito, T. y Miyata, T. (2015). Pervaporative dehydration characteristics of an ethanol/water azeotrope through various chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, 120: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.032>
- van Bergeijk, D.A., Terlouw, B.R., Medema, M.H. y van Wezel, G.P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18: 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>
- van der Does, H.C., Constantin, M.E., Houterman, P.M., Takken, F.L.W., Cornelissen, B.J.C., Haring, M.A., van den Burg, H.A. y Rep, M. (2019). *Fusarium oxysporum* colonizes the stem of resistant tomato plants, the extent varying with the R-gene present. *European Journal of Plant Pathology*, 154(1): 55-65. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1596-3>

- van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J. y Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63(1): 39-59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Vijayabharathi, R., Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vasanth Kumar, M., Srinivas, V. y Mamta, S. (2018). *Streptomyces* sp. as plant growth-promoters and host-plant resistance inducers against *Botrytis cinerea* in chickpea. *Biocontrol Science and Technology*, 28(12): 1140-1163. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1515890>
- Villanueva-Arce, R., Aguilar-Pompa, C.A., Gómez y Gómez, Y., Toro, V.D., Piña-Guzmán, A. y Bautista-Baños, S. (2013). Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Agrociencia*, 47(7): 691-705.
- Vincelli, P. y Tisserat, N. (2008). Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. *Plant Disease*, 92(5): 660-669. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-5-0660>
- Vlot, A.C., Sales, J.H., Lenk, M., Bauer, K., Brambilla, A., Sommer, A. y Nayem, S. (2021). Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist*, 229(3): 1234-1250. <https://doi.org/10.1111/nph.16953>
- Wang, Q., Mao, Y., Li, S., Li, T., Wang, J., Zhou, M. y Duan, Y. (2022). Molecular mechanism of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70: 7039–7048.
- Wang, Q., Zuo, J. hua, Wang, Q., Na, Y. y Gao, L.P. (2015). Inhibitory effect of chitosan on growth of the fungal phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Sclerotinia* rot of carrot. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(4): 691-697. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60800-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60800-5)
- Wang, S., Fang, X., Liang, K., Li, S., Han, S. y Zhu, T. (2023). Cloning, expression and antifungal effect of the recombinant chitinase from *Streptomyces sampsonii* KJ40. *Ciência Rural*, 53: e20210663. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210663>
- Wang, X., Du, Y. y Liu, H. (2004). Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate Polymers*, 56(1): 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.007>
- Widada, J., Damayanti, E., Alhakim, M.R., Yuwono, T. y Mustofa, M. (2021). Two strains of airborne *Nocardiosis* alba producing different volatile organic compounds (VOCs) as biofungicide for *Ganoderma boninense*. *FEMS Microbiology Letters*, 368(20): fnab138. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab138>
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J. y Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2): 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>
- Xia, X., Liu, J., Huang, L., Zhang, X., Deng, Y., Li, F., Liu, Z. y Huang, R. (2022). Molecular details of actinomycin D-Treated MRSA revealed via high-dimensional data. *Marine drugs*, 20(2): 114. <https://doi.org/10.3390/md20020114>
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H.O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H. y Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology*, 151(9), 2899-2905. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28139-0>
- Yandigeri, M.S., Malviya, N., Solanki, M.K., Shrivastava, P. y Sivakumar, G. (2015). Chitinolytic *Streptomyces vinaceusdrappus* S5MW2 isolated from Chilika lake, India enhances plant growth and biocontrol efficacy through chitin supplementation against *Rhizoctonia solani*.

- World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8): 1217-1225.
<https://doi.org/10.1007/s11274-015-1870-x>
- Yang, D., Wang, L., Wang, T., Zhang, Y., Zhang, S. y Luo, Y. (2021). Plant growth-promoting rhizobacteria HN6 induced the change and reorganization of *Fusarium* microflora in the rhizosphere of banana seedlings to construct a healthy banana microflora. *Frontiers in Microbiology*, 12: 685408.
- Yin, H., Du, Y. y Dong, Z. (2016). Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: two similar but different plant elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 7: 522.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00522>
- Yin, H., Du, Y. y Zhang, J. (2009). Low molecular weight and oligomeric chitosans and their bioactivities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(16): 1546-1559.
<https://doi.org/10.2174/156802609789909795>
- Yin, H., Li, Y., Zhang, H.Y., Wang, W.X., Lu, H., Grevsen, K. y Du, Y. (2013). Chitosan oligosaccharides–triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *International Journal of Plant Sciences*, 174(4): 722-732.
<https://doi.org/10.1086/669721>
- Zamoum, M., Goudjal, Y., Sabaou, N., Barakate, M., Mathieu, F. y Zitouni, A. (2016). Biocontrol capacities and plant growth-promoting traits of endophytic actinobacteria isolated from native plants of Algerian Sahara. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 122: 215-223.
- Zargar, V., Asghari, M. y Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3): 204-226.
<https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zhang, D., Lu, Y., Chen, H., Wu, C., Zhang, H., Chen, L. y Chen, X. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. *The Journal of Antibiotics*, 73: 265-282.
- Zheng, K., Lu, J., Li, J., Yu, Y., Zhang, J., He, Z. y Wang, X. (2021). Efficiency of chitosan application against *Phytophthora infestans* and the activation of defence mechanisms in potato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182: 1670-1680.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.097>
- Zhou, D., Jing, T., Chen, Y., Yun, T., Qi, D., Zang, X., Zhang, M., Wei, Y., Li, K., Zhao, Y., Wang, W. y Xie, J. (2022). Biocontrol potential of a newly isolated *Streptomyces* sp. HSL-9B from mangrove forest on postharvest anthracnose of mango fruit caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Food Control*, 135: 108836.
- Zou, N., Zhou, D., Chen, Y., Lin, P., Chen, Y., Wang, W., Xie, J. y Wang, M. (2021). A novel antifungal actinomycete *Streptomyces* sp. strain h3-2 effectively controls banana *Fusarium* wilt. *Frontiers in Microbiology*, 12: 706647. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.706647>