

ACTIVIDAD *in vitro* DE *Bacillus* spp. EN LA INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO MICELIAL DE *Fusarium equiseti* Y *Fusarium solani* AISLADO DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

In vitro ACTIVITY OF *Bacillus* spp. ON MYCELIAL GROWTH INHIBITION OF *Fusarium equiseti* AND *Fusarium solani* ISOLATED FROM HABANERO PEPPERS (*Capsicum chinense* Jacq.)

Miguel A. Mejía-Bautista, Jairo Cristóbal-Alejo, José M. Tun-Suárez, Arturo Reyes-Ramírez*

Instituto Tecnológico de Conkal, km 16.3, Avenida Tecnológico s/n. 97345. Conkal, Yucatán. México. (areyes.itconkal@gmail.com)

RESUMEN

Fusarium puede inducir marchitez en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), con frecuencia está en el suelo y en especies diversas y el uso de fungicidas sistémicos es común para su control. Esta enfermedad demanda investigación enfocada a disminuir el uso de fungicidas que propician la permanencia de poblaciones resistentes de fitopatógenos y contaminan el ambiente. Las especies de *Bacillus* antagonistas son una alternativa para el control de fitopatógenos, como *Fusarium* spp., causantes de etiologías fúngicas en cultivos como el chile habanero. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *F. solani*, causantes de la marchitez en chile habanero, en confrontaciones directas y mediante filtrados libres de células para inhibir la germinación de conidios, y detectar la presencia de los genes encargados de dirigir la síntesis de lipopéptidos involucrados con actividad antifúngica. La hipótesis fue que al menos una cepa de *Bacillus* spp. inhibe a *F. equiseti* y *F. solani*, y es posible detectar al menos un gen de la síntesis de lipopéptidos. El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones. Todos los antagonistas inhibieron el crecimiento micelial de *F. equiseti* (2.15 a 71.55 %) y *F. solani* (3.76 a 69.16 %). El filtrado de *Bacillus subtilis* CBRF8 inhibió 100 % la germinación de los conidios y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplificó tres fragmentos de los genes *bamC*, *ituA* y *sfp*, que corresponden a la bacilomicina D, la iturina A y la surfactina.

Palabras clave: *Bacillus*, *Fusarium*, antagonista, fitopatógenos, lipopéptidos.

ABSTRACT

Fusarium can induce wilt in habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.), it is frequently found in the soil and in various plant species and the use of systemic fungicides is common for its control. This disease demands research focused on decreasing the use of fungicides that favor the permanence of resistant populations of plant pathogens and pollute the environment. Antagonists *Bacillus* species are an alternative for plant pathogen control, such as *Fusarium* spp., causing fungal etiologies in crops such as the habanero peppers. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* activity of *Bacillus* spp. on inhibiting mycelial growth of *Fusarium equiseti* and *F. solani*, which cause wilting in habanero peppers, in direct confrontations and by using cellfree filtrates to inhibit conidia germination. These allow to detect the presence of the genes responsible for directing the lipopeptides synthesis involved in antifungal activity. Our hypothesis was that at least one strain of *Bacillus* spp. inhibits *F. equiseti* and *F. solani*, and is possible to detect at least one gene for lipopeptid synthesis. The experimental design was completely randomized with four replications. All antagonists inhibited the mycelial growth of *F. equiseti* (2.15 to 71.55 %) and *F. solani* (3.76 to 69.16 %). Filtrates of *Bacillus subtilis* CBRF8 inhibited 100 % conidia germination. Polymerase chain reaction (PCR) amplified three fragments of the genes: *bamC*, *ituA* and *sfp* which correspond to bacillomycin D, iturin A and surfactin.

Keywords: *Bacillus*, *Fusarium*, antagonist, phytopathogen, lipopeptides.

INTRODUCTION

Phytopathogens such as *Fusarium* are the main cause of plant wilting. Can also induce root rotting, chlorosis and defoliation (Vásquez-

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2015. Aprobado: julio, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 50: 1123-1135. 2016.

INTRODUCCIÓN

Los fitopatógenos como *Fusarium* spp. son los causantes principales de la marchitez de las plantas e inducen la pudrición de la raíz, clorosis y defoliación (Vásquez-López *et al.*, 2009; Villanueva-Arce *et al.*, 2013). Para controlar estos patógenos se aplican con mayor frecuencia fungicidas, organosintéticos que con el tiempo, además de contaminar el ambiente y afectar la salud humana, seleccionan cepas fúngicas resistentes, y su efectividad se reduce (Novaes *et al.*, 2005; Rubio-Reque *et al.*, 2008). En la rizosfera existen bacterias antagonistas, capaces de ejercer control de patógenos (Guillén-Cruz *et al.*, 2006). Este antagonismo se atribuye, en parte, a la producción de una gama de metabolitos secundarios como bacteriocinas, antibióticos, enzimas extracelulares (Mojica-Marín *et al.*, 2009), y lipopéptidos (iturina, surfactina, fengicina y bacilomycin) (Ramarathnam *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2011; Berić *et al.*, 2012). Las especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* son un potencial para detectar metabolitos para controlar fitopatógenos, comunes y con resistencia a fungicidas químicos, ya que producen estos polipéptidos (Cochrane y Vederas, 2014). La aplicación de *Bacillus subtilis* que liberan péptidos, inhiben el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* y *F. solani* (Radzhabov y Davranov, 2010). Extractos de lipopéptidos de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* mostraron actividad antifúngica contra *F. moniliforme*, con modificaciones en la pared celular de la hifa con hinchazón y protuberancias esféricas. Esos extractos contenían compuestos relacionados con iturina y fengicina. La protección puede funcionar por la secreción de lipopéptidos por las rizobacterias, ya que inhiben a los patógenos; además, otros mecanismos pueden actuar, como la inducción de genes relacionados con la patogénesis de plantas hospederas, ya que el extracto lipopéptido por sí solo no aumenta la expresión de los genes (Gond *et al.*, 2015). En este estudio se estimó la efectividad antagónica de aislados de la clase Bacilli contra dos especies de *Fusarium*, causantes de marchitez en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), mediante confrontaciones directas e inhibición de la germinación de conidios por filtrados bacterianos. También, se analizó la actividad de genes se analizó, asociados con la biosíntesis de lipopéptidos involucrados con la actividad antifúngica. La hipótesis fue que una cepa de *Bacillus* spp. tiene actividad inhibitoria frente a *F. equiseti* y *F. solani* y tiene al menos un gen de la síntesis de lipopéptidos.

López *et al.*, 2009; Villanueva-Arce *et al.*, 2013). To control these pathogens, organosintetic fungicides are frequently applied, which in time, pollute the environment and affect human health and selected resistant fungal strains, thereby reducing their effectiveness (Novaes *et al.*, 2005; Rubio-Reque *et al.*, 2008). There are antagonists bacteria in the rhizosphere, able to exert pathogenic control (Guillén-Cruz *et al.*, 2006). This antagonism is partially attributed to the production of a range of secondary metabolites such as bacteriocins, antibiotics, extracellular enzymes (Mojica-Marín *et al.*, 2009), and lipopeptides (iturin, surfactin, fengycin and bacillomycin) (Ramarathnam *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2011; Berić *et al.*, 2012). *Bacillus* and *Paenibacillus* species represent a potential to detect metabolites for phytopathogen control, both common and resistant to chemical fungicides, given that they produce these polypeptides (Cochrane and Vederas, 2014). The administration of *Bacillus subtilis* that release peptides, inhibit the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* (Radzhabov and Davranov, 2010). Lipopeptide extracts from *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* showed antifungal activity against *F. moniliforme*, which produced changes in the hyphae's cell wall, causing spherical swelling and bumps. These extracts contain compounds related to iturin and fengycin. Protection may function by the secretion of lipopeptides by the rhizobacteria, given that they inhibit pathogens; other mechanisms can also act, like the induction of pathogenesis related genes of host plants, as the lipopeptide extract by itself does not increase gene expression (Gondgenes *et al.*, 2015). In this study, we estimated the antagonistic effectiveness of Bacilli class isolates on two *Fusarium* species, as these are the cause of wilting in habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.), by direct confrontation and conidia germination inhibition by bacterial filtrates. Also, gene activity was analyzed and associated with the biosynthesis of the lipopeptides involved in antifungal activity. Our hypothesis was that a strain of *Bacillus* spp. has inhibitory activity against *F. equiseti* and *F. solani* and has at least one gene for lipopeptide synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms used

Sixteen strains of the Bacilli class were used in this study with reported antifungal activity, previously isolated from soil

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados

Las cepas del estudio fueron 16, de la Clase Bacilli, con reporte de actividad antifúngica, aisladas previamente de muestras de suelo de la península de Yucatán, México (Sosa *et al.*, 2012), que pertenecen a la colección del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. Las bacterias se activaron en agar nutritivo (AN) (BD Bioxon®, Becton Dickinson de México), se verificó su pureza mediante el crecimiento de colonias homogéneas, la presencia de células Gram positivas y la formación de endosporas. Todas las cepas se cultivaron en el mismo medio hasta su autólisis a 28 °C por 4 d y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Aislamiento e identificación de *Fusarium* spp.

Muestras de tallos y raíces se recolectaron de plantas de chile habanero, con síntomas característicos de la enfermedad, en campo e invernadero (21° 04' N y 89° 31' O) de las áreas de investigación y producción del Instituto Tecnológico de Conkal. Secciones de 0.5 cm se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 %, por 30 s, se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo agar papa y dextrosa (PDA) (BD Bioxon®) y se incubaron a 28 °C por 72 h, luego se purificaron. Una identificación preliminar de los patógenos se hizo mediante sus caracteres morfotaxonomicos (Nelson *et al.*, 1983; Barnett and Hunter, 1999).

Para confirmar la identificación específica de los hongos se hicieron extracciones de ADN (Liu *et al.*, 2002) de micelio de cultivos monospóricos. Para esto se analizó la región ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA; los iniciadores fueron los reportados por White *et al.* (1990), ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), la amplificación se realizó por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que incluyó desnaturalización inicial por 2 min a 95 °C, luego 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (SIGMA®, EE.UU.) y un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen® EE.UU.). Los productos de PCR amplificados los secuenciaron en MacroGen (www.macrogenusa.com). Las secuencias se compararon con la base de datos del Banco de Genes del Nacional Center For Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Antagonismo de aislados bacterianos contra *Fusarium* spp.

Los bioensayos se hicieron en cajas Petri con medio PDA; en el centro de la caja se colocaron secciones de 0.5 cm de

samples from the Yucatan Peninsula, Mexico (Sosa *et al.*, 2012), which belong to the Instituto Tecnológico de Conkal collection, Yucatan. Bacteria were activated on (NA) nutrient agar (BD Bioxon®, Becton Dickinson Mexico). Its purity was verified by growing homogeneous colonies, the presence of Gram positive cells and endospores formation. All strains were grown in the same medium until autolysis at 28 °C for 4 d and stored at 4 °C until they were use.

Isolation and identification of *Fusarium* spp.

Samples of stems and roots were collected from habanero pepper plants with characteristic symptoms of the disease, in field and greenhouse areas (21° 04' N and 89° 31' W) of research and production, at the Instituto Tecnológico de Conkal. Sections of 0.5 cm were disinfected with 2 % sodium hypochlorite for 30 s, washed twice with sterile distilled water, seeded in Petri dishes with growth medium potato dextrose agar (PDA) (BD Bioxon®) and incubated at 28 °C for 72 h, then purified. A preliminary pathogen identification was done based on their morfotaxonomic characters (Nelson *et al.*, 1983; Barnett and Hunter, 1999).

DNA extractions were taken from monosporic mycelium cultures in order to confirm the specific identification of the fungi (Liu *et al.*, 2002). For this, the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region of was analyzed; primers were those reported by White *et al.* (1990), ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), amplification was performed by PCR (polymerase chain reaction). This included an initial denaturation for 2 min at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 54 °C for 30 s and a 1 min extension at 72 °C, and a final 5 min extension at 72 °C. The amplified products were visualized *via* electrophoresis on 1 % agarose gel (SIGMA®, USA) and a 1 kb molecular weight marker (Invitrogen® USA). The amplified PCR products were sequenced at MacroGen (www.macrogenusa.com). The sequences were compared with the GenBank database from the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program.

Antagonism of bacterial isolates against *Fusarium* spp.

Bioassays were done in Petri dishes with PDA medium; in the center of each box, 0.5 cm diameter sections of the phytopathogen mycelium and 6 µL of a 1x10⁷ UFC suspension of the bacterial isolates. This was obtained by scraping with a sterile glass slide, from a bacterial culture in AN, after a 5 d incubation period. The suspension was applied at four equidistant points around the fungus, 2 cm apart. The control consisted of Petri dishes with the fungal pathogen but without

diámetro del micelio del fitopatógeno y 6 μL de una suspensión de 1×10^7 UFC de los aislados bacterianos, obtenida por raspado con un portaobjeto estéril, de un cultivo bacteriano en AN de 5 d de incubación. La suspensión se aplicó en cuatro puntos equidistantes alrededor del hongo y a 2 cm de distancia. El testigo fue cajas Petri con el hongo patógeno sin las cepas bacterianas. Las cajas se incubaron a 28 °C. Después de 7 d se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICR) con la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004) y se midió el halo de inhibición, entre la colonia fúngica y las cepas bacterianas. La inhibición de conidios se determinó con la selección de los aislados que presentaron un porcentaje de ICR de al menos 65 % y mostraron halo de inhibición mayor a 3.0 mm al menos contra una de las cepas fúngica.

Inhibición de germinación de conidios por filtrados bacterianos

Los aislados bacterianos se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de medio líquido Luria-Bertani® (LB) (DIBICO®, México), y adicionó 1 mL de suspensión bacteriana de 1×10^7 UFC. Los matraces con la suspensión de células bacterianas se mantuvieron en agitación orbital (MaxQ4450, Thermo Scientific, EE.UU.) a 200 rpm, por 72 h a 29 °C. El sobrenadante se recuperó por centrifugación a 8765 x g, por 10 min, se filtró con filtros tamaño de poro 0.45 μm (Merck® Millipore, Alemania) y se obtuvo el filtrado libre de bacterias. Una suspensión de 1×10^8 conidios mL^{-1} de *Fusarium* spp. se mezcló con el filtrado bacteriano (1:1 v/v). La mezcla se sembró en cajas Petri con PDA, a cada punto de siembra se colocó un cubreobjetos y se registró la cantidad de conidios germinados después de 3, 5, 8 y 10 h con un microscopio óptico DM500 (Leica Microsystems, Suiza) y objetivo de 100X; los valores se transformaron a porcentaje. Esta cuantificación se suspendió cuando en 100 conidios, al azar del testigo sin filtrado, el tubo germinativo se extendió más de la mitad de la longitud del tamaño de la célula fúngica (Mahadatanapuk *et al.*, 2007, Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014).

Identificación de los aislados bacterianos antagonistas

Los aislados seleccionados para los ensayos de inhibición de la germinación que tuvieron identificación molecular previa se identificaron. Esto se hizo con el análisis de la secuencia del gen 16S rDNA, y los iniciadores Eubac27F y Eubac1492R (Delong, 1992). Para extraer el DNA se utilizó el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega®, EE.UU.). Las condiciones de reacción incluyeron solución amortiguadora 1X de PCR, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de mezcla de dNTPs, 1.0 μM de cada oligonucleótido, 2.0 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen® EE.UU.) y

bacterial strains. The boxes were incubated at 28 °C. After 7 d the mycelial growth inhibition percent (ICR) was determined with the formula proposed by Ezziyyani *et al.* (2004), also the inhibition halo, between the fungal colony and bacterial strains. Conidia inhibition was determined by the selecting the strains showing a percentage of ICR of at least 65 % and showed an inhibition halo greater at 3.0 mm at least against one of the fungal strains.

Conidia germination inhibition by filtered bacterial

Bacterial isolates were cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks, with a 100 mL of Luria-Bertani liquid medium® (LB) (DIBICO®, Mexico), to which 1 mL of bacterial suspension of 1×10^7 UFC were added. Flasks with the bacterial cells suspension were maintained in an orbital shaker (MaxQ4450, Thermo Scientific, USA) at 200 rpm for 72 h at 29 °C. The supernatant was then recovered by centrifugation at 8765 x g for 10 min, then filtered through Merck® filters (Millipore Germany) of 0.45 μm . and a bacteria free filtrate was obtained. A suspension of 1×10^8 conidia mL^{-1} of *Fusarium* spp. was mixed with the bacteria filtrate (1:1 v/v). The mixture was seeded in Petri dishes with PDA. Each seed point had a coverslip placed on. The number of germinated conidia after 3, 5, 8 and 10 h was recorded with an optical microscope DM500 (Leica Microsystems, Switzerland) with a 100X objective; values were then converted to percentage. This quantification was suspended when in 100 conidia in random control without filtering, the germ tubes extended over half the length of the size of the fungal cells (Mahadatanapuk *et al.*, 2007; Ruiz-Sanchez *et al.*, 2014).

Identification of isolated bacterial antagonists

The selected Isolates for germination inhibition assays which had previous had a molecular identification were identified. This was done with the analysis of the 16S rDNA gene sequence, and the Eubac27F and Eubac1492R starters (Delong, 1992). To extract the DNA a Wizard Genomic Purification Kit was used (Promega®, USA). The reaction conditions included 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs mix, 1.0 μM of each oligonucleotide, 2.0 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen® USA) and 1 μL of DNA at 200 ng, to a final 50 μL of reaction mixture volume. PCR amplification (in a TECHNE-312, US thermocycler) included initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 32 cycles (denaturalization at 94 °C for 1 min, 52 °C alignment for 1 min and a 72 °C extension for 1.45 min), final extension at 72 °C for 7 min and 4 °C final temperature. The amplified products and the sequences received the same procedure done with the fungi.

1 μ L de DNA a 200 ng, a un volumen final de 50 μ L de mezcla de reacción. La amplificación por PCR (en un termociclador TECHNE-312, EE.UU.) incluyó desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 32 ciclos (desnaturalización 94 °C por 1 min, alineación 52 °C por 1 min y una extensión 72 °C por 1.45 min), extensión final a 72 °C por 7 min y temperatura final de 4 °C. Los productos amplificados y las secuencias tuvieron el mismo procedimiento realizado con los hongos.

Detección de genes en bacterias aisladas para la producción de lipopéptidos

Los aislados bacterianos, para detectar genes que codifican la producción de lipopéptidos, fueron los mismos evaluados en la inhibición de la germinación de conidios por filtrados bacterianos, ya que éstos se consideraron candidatos que podrían producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Athukorala *et al.*, 2009). Para detectar genes *bamC* (bacilomicina D), *fenD* (fengicina), *ituA* (iturina A), *zmaR* (zwitermicina A) y *sfp* (surfactina) se utilizaron los pares de oligonucleótidos reportados por Ramarathnam *et al.* (2007) y Athukorala *et al.* (2009) BACC1 F (GAAGGACACGGCAGAGAGTC) y BACC1 R (CGCTGATGACTGTTTCATGCT); FEND1 F (TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT) y FEND1 R (GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC); ITUD1 F (GATGCGATCTCCTTGGATGT) y ITUD1 R (ATCGTCATGTGCTGCTTGAG); ZWITR2 F (TTGGGAGAATATACAGCTCT) y ZWITR2 R (GACCTTTTGAATGGGCGTA) y SUR3 F (ACAGTATGGAGGCATGGTC) SUR3 R (TTCCGCCACTTTTTCAGTTT) (Invitrogen®, EE.UU.). El programa PCR para BACC1 F/R fue una desnaturalización a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1.45 min y extensión final a 72 °C por 6 min (Ramarathnam *et al.*, 2007); para ITUD1F/R y SUR3 F/R fue desnaturalización a 94 °C por 15 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 2 min y extensión final a 72 °C por 10 min (Stanković *et al.*, 2012); para FEND1 F/R fue una desnaturalización a 94 °C por 3 min, 45 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 62 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1.45 min y extensión final a 72 °C por 6 min (Ramarathnam *et al.*, 2007) y para la ZWITR2 F/R fue desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 15 s, alineamiento a 60 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 2 min y extensión final a 72 °C por 4 min (Basurto *et al.*, 2012).

Análisis de datos

En diseño experimental fue completamente al azar, y los tratamientos tuvieron cuatro repeticiones. Con los datos se realizó

Detection of genes in isolated bacteria for lipopeptide production

The bacterial isolates to detect genes encoding lipopeptide production were the same as those used in the evaluation of the conidia germination inhibition by bacterial filtered, as these were candidates that could produce secondary metabolites with antifungal activity (Athukorala *et al.*, 2009). In order to detect *bamC* (bacillomycin D), *Fend* (fengycin), *ituA* (iturin A), *zmaR* (zwitermicin A) and *sfp* (surfactin) genes, the oligonucleotide pairs reported by Ramarathnam *et al.* (2007) and Athukorala *et al.* (2009) were used. BACC1 F (GAAGGACACGGCAGAGAGTC) and BACC1 R (CGCTGATGACTGTTTCATGCT); FEND1 F (TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT) and FEND1 R (GCTGTCCGTTCTGCTTTTTTC); ITUD1 F (GATGCGATCTCCTTGGATGT) and ITUD1 R (ATCGTCATGTGCTGCTTGAG); ZWITR2 F (TTGGGAGAATATACAGCTCT) and ZWITR2 R (GACCTTTTGAATGGGCGTA), SUR3 F (ACAGTATGGAGGCATGGTC) SUR3 R (TTCCGCCACTTTTTCAGTTT) (Invitrogen®, USA). The PCR program BACC1 F / R consisted on a denaturation at 94 °C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1.45 min and final extension at 72 °C for 6 min (Ramarathnam *et al.*, 2007); for ITUD1F / R and SUR3 F / R consisted of denaturation at 94 °C for 15 min, 30 denaturation cycles at 94 °C for 30 s, alignment at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 10 min (Stankovic *et al.*, 2012.); for FEND1 F/R consisted of denaturation at 94 °C for 3 min, 45 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, alignment at 62 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1.45 min and final extension at 72 °C for 6 min (Ramarathnam *et al.*, 2007) and for ZWITR2 F / R consisted of denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 30 denaturation cycles at 94 °C for 15 s, alignment at 60 °C for 45 s, extension at 72 °C for 2 min and final extension at 72 °C for 4 min (Basurto *et al.*, 2012).

Data analysis

The experimental design was completely randomized and treatments had four repetitions. An ANOVA was performed on the data, with a previous data transformation to arcsin [$y = \arcsin(\sqrt{x/100})$], and means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). Data was analyzed with SAS Ver. 9.1 (SAS Institute Inc. 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of fungal strains

Two *Fusarium* species were isolated from *Capsicum chinense* Jacq. plants with necrosis

ANDEVA, con transformación previa de datos de los porcentaje en arcoseno [$y = \arcseno(\sqrt{x/100})$], y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el paquete estadístico SAS Ver. 9.1 (SAS Institute Inc. 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de las cepas fúngicas

Dos especies de *Fusarium* se aislaron de plantas de *Capsicum chinense* Jacq. con síntomas de necrosis en el tallo y las raíces. Uno se identificó como *F. equiseti* con registro ITCF1, que presentó micelio abundante, aéreo algodonoso, blanco, con crecimiento rápido y color anaranjado en su cara inferior. El estudio microscópico reveló la presencia de macroconidios abundantes con células apicales atenuadas, de uno a cuatro células, microconidios en presencia generalmente menor de células simples, ovales o reniformes, producidas en cabezas falsas. El otro aislado fue identificado como *F. solani* con registro ITCF2, y micelio aéreo escaso, crecimiento relativamente más lento, y color crema en ambos lados. El estudio microscópico reveló la presencia de macroconidios cilíndricos escasos, célula basal y apical redonda simple o de una célula; microconidios abundantes, generalmente de células simples, cilíndricas y en algunos casos célula apical atenuada y célula basal con forma de pie (Nelson *et al.*, 1983; Escalona *et al.*, 2006). El análisis de la región ITS1-5.8s-ITS2 del rDNA confirmó similitud de 100 % de la cepa ITCF1 con *F. equiseti* (Gen Bank JQ690081) y en el caso de ITCF2 la similitud fue de 99 % con *F. solani* (JQ910159). Estos fitopatógenos son importantes por las pérdidas que causan en la producción de cultivos, como *C. annuum* (Martínez *et al.*, 2011; Sanzón-Gómez *et al.*, 2012), trigo (*Triticum aestivum* L.), soya (*Glycine max* L.) y chícharo (*Pisum sativum* L.) (Ivić *et al.*, 2009; Espinoza *et al.*, 2011), maíz (*Zea mays* L.) (Zainudin *et al.*, 2011), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y calabaza (*Cucurbita pepo* L.) (Montano *et al.*, 2012; Roberti *et al.*, 2012).

Actividad antagónica de aislados bacterianos contra *F. equiseti* y *F. solani*

ICR de *Fusarium* spp. El análisis de varianza para la variable ICR mostró diferencias significativas entre los 16 aislados bacterianos ($p \leq 0.05$). Los intervalos

symptoms in stems and roots. One was identified as *F. equiseti* with ITCF1 registration, which had abundant, aerial cottony white mycelium, with rapid growth and orange color on its underside. Microscopic examination revealed the presence of abundant macroconidia with attenuated apical cells, of one to four cells. Microconidia generally present, usually less than simple cells, oval or kidneyshaped produced in false heads. The other isolated species was identified as *F. solani* with ITCF2 registration. It had sparse aerial mycelium, relatively slower growth, and cream color on both sides. Microscopic examination revealed the presence of few cylindrical macroconidia, round simple basal and apical cells or single cell; abundant microconidia, generally single cell, and in some cases cylindrical and basal attenuated apical foot shaped cells (Nelson *et al.*, 1983; Escalona *et al.*, 2006). The analysis of the ITS1-5.8s-ITS2 rDNA region confirmed a 100 % similarity of the ITCF1 strain with *F. equiseti* (GenBank JQ690081) and in ITCF2 case, the similarity was of 99 % regard *F. solani* (JQ910159). These are important plant pathogens that cause losses in crop production, such as *C. annuum*. (Martínez *et al.*, 2011; Sanzón-Gómez *et al.*, 2012), wheat (*Triticum aestivum* L.), soybean (*Glycine max* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) (Ivić *et al.*, 2009; Espinoza *et al.*, 2011), corn (*Zea mays* L.) (Zainudin *et al.*, 2011), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and squash (*Cucurbita pepo* L.) (Montano *et al.*, 2012; Roberti *et al.*, 2012).

Bacterial isolates antagonistic activity against *F. Equiseti* and *F. Solani*

Fusarium spp. ICR. The analysis of variance for the ICR variable showed significant differences between the 16 bacterial isolates ($p \leq 0.05$). ICR intervals in both species of *Fusarium* were from 2.15 to 71.55 %. In *F. equiseti* ITCF1 bacterial isolates with CBRF8, CBCK41, CBMT51 and CBRM17 registration were those who induced the highest averages of ICR percentage, with 65.70, 66.15, 71.23 and 71.55 % ($p \leq 0.05$). In *F. solani* ITCF2 the CBRF15, CBRF9 and CBRF8 isolates outperformed on average the other bacterial isolates ($p \leq 0.05$), given that they caused an ICR of 61.60, 62.67 and 69.16 % (Table 1). The antifungal activity of the bacterial isolates become clear in *Fusarium* sp. when it was confronted with *B. subtilis* LSB4 and *Bacillus* sp. LSB9, as they

de ICR en ambas especies de *Fusarium* fueron 2.15 a 71.55 %. En *F. equiseti* ITCF1 los aislados bacterianos con registro CBRF8, CBCK41, CBMT51 y CBRM17 fueron los que indujeron los promedios mayores en el porcentaje de ICR, con 65.70, 66.15, 71.23 y 71.55 % ($p \leq 0.05$). En *F. solani* ITCF2 los aislados CBRF15, CBRF9 y CBRF8 en promedio superaron a los otros aislados bacterianos ($p \leq 0.05$), ya que causaron ICR de 61.60, 62.67 y 69.16 % (Cuadro 1). La actividad antifúngica de los aislados bacterianos se evidenció en *Fusarium* sp. cuando se confrontó con *B. subtilis* LSB4 y *Bacillus* sp. LSB9, pues demostraron inhibición de crecimiento micelial de 90 y 90.4 % (Badía *et al.*, 2011). Las inhibiciones en esos estudios superaron nuestros resultados. Pero, en otros casos la efectividad con *F. oxysporum* fue similar a los estimados para los aislados CBRF8, CBRM17 y CBMT51 (Li *et al.*, 2012b) o menos efectivos, aunque se trató de especies similares o

showed mycelial growth inhibition of 90 and 90.4 % each (Badía *et al.*, 2011). Inhibitions in those studies exceeded our results. However, in other cases, the effectiveness with *F. oxysporum* was similar to that estimated for isolated CBRF8, CBRM17 and CBMT51 (Li *et al.*, 2012b), or less effective, although it came to similar or different species of the fungi (Romano *et al.*, 2013; Sarti and Miyazaki, 2013) and even when evaluated on other *Fusarium* strains. Antagonism response is associated with the synthesis of lipopeptides like iturin, surfactin, fengicyn and bacillomycin (Ramarathnam *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2011; Berić *et al.*, 2012) and secondary metabolites that can generate an inner lysis area and a thickening edge in the inhibition zone. This effect was observed in *F. equiseti* and *F. solani*. They also affected the radial growth of the fungi, as it happened against *Curvularia lunata* (Basha y Ulaganathan, 2002; Orberá *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Inhibición de crecimiento y halos de inhibición por acción de aislados bacterianos contra cepas de *Fusarium equiseti* y *F. solani*.

Table 1. Growth inhibition and inhibition halos by action of bacterial isolates against strains of *Fusarium equiseti* and *F. solani*.

Aislados	<i>F. equiseti</i> ITCF1		<i>F. solani</i> ITCF2	
	ICR (%)	Halos (mm)	ICR (%)	Halos (mm)
CBRF8	65.70 ± 3.65 ab	0.00 ± 0.0 e	69.16 ± 1.77 a	0.00 ± 0.0 b
CBRF9	54.85 ± 2.84 hijk	0.00 ± 0.0 e	62.67 ± 6.07 ab	0.00 ± 0.0 b
CBRF12	60.54 ± 2.59 gh	0.00 ± 0.0 e	58.73 ± 0.60 bcde	0.00 ± 0.0 b
CBRF15	58.24 ± 1.82 hi	1.49 ± 0.17 d	61.60 ± 1.57 bc	1.30 ± 0.21 a
CBRF24	57.75 ± 4.72 hi	1.02 ± 0.72 d	58.25 ± 2.44 bcdef	0.00 ± 0.0 b
CBRM17	71.55 ± 0.71 a	5.72 ± 0.32 a	52.74 ± 2.45 defg	0.00 ± 0.0 b
CBMT2	64.26 ± 2.00 bc	3.52 ± 0.51 b	52.60 ± 1.82 efg	0.00 ± 0.0 b
CBMT51	71.23 ± 1.18 a	6.10 ± 0.67 a	55.02 ± 4.42 cdef	0.00 ± 0.0 b
CBCC2	48.76 ± 3.66 g	0.00 ± 0.0 e	53.66 ± 2.16 defg	0.00 ± 0.0 b
CBDG60	60.71 ± 1.35 bcd	0.00 ± 0.0 e	59.58 ± 1.24 bcd	0.00 ± 0.0 b
CBSN67	53.35 ± 1.90 efg	0.00 ± 0.0 e	55.45 ± 2.85 cdef	0.00 ± 0.0 b
CBMN22	50.60 ± 4.30 fg	0.00 ± 0.0 e	51.58 ± 1.26 fg	0.00 ± 0.0 b
CBCK36	51.14 ± 1.14 fg	0.00 ± 0.0 e	47.81 ± 1.63 g	0.00 ± 0.0 b
CBCK41	66.15 ± 0.88 ab	2.39 ± 0.37 c	20.19 ± 3.43 h	0.00 ± 0.0 b
CBCK46	57.00 ± 3.29 def	0.00 ± 0.0 e	3.76 ± 2.71 i	0.00 ± 0.0 b
CBCK47	2.15 ± 0.77 h	0.00 ± 0.0 e	57.24 ± 3.01 bcdef	0.00 ± 0.0 b
Testigo	0.00 ± 0.0 h	0.00 ± 0.0 e	0.00 ± 0.0 i	0.00 ± 0.0 b
DMS	6.55	0.76	6.96	0.12

Medias con letra distinta son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ICR: inhibición de crecimiento radial; DMS: Diferencia mínima significativa ♦ Means with different letter are statistically significant ($p \leq 0.05$). ICR: inhibition of radial growth; LSD: Least significant difference.

diferentes del hongo (Romano *et al.*, 2013; Sarti y Miyazaki, 2013), e incluso cuando se evaluó en otras cepas de *Fusarium*. La respuesta de antagonismo está asociado con la síntesis de lipopéptidos como iturina, surfactina, fengicina y bacilomina (Ramarathnam *et al.*, 2007; Mora *et al.*, 2011; Berić *et al.*, 2012) y metabolitos secundarios que pueden generar una zona de lisis interna y engrosamiento del borde en la zona de inhibición. Este efecto se observó en *F. equiseti* y en *F. solani*, y también afectaron el crecimiento radial de los hongos, como ocurrió contra *Curvularia lunata* (Basha y Ulaganathan, 2002; Orberá *et al.*, 2009).

Presencia y tamaño de halo de inhibición

El análisis de varianza de los halos de inhibición mostró diferencias significativas entre los 16 aislados bacterianos ($p \leq 0.05$). Los halos generados en ambas especies de *Fusarium* fueron de 1.30 a 6.10 mm. En *F. equiseti* ITCF1 los aislados CBRM17 y CBMT51 fueron diferentes al resto de los aislados ($p \leq 0.05$), porque generaron los halos mayores de inhibición (5.72 y 6.10 mm). En *F. solani* ITCF2 sólo el aislado CBRF15 generó un halo de inhibición de 1.30 mm, pero no fue la bacteria con inhibición mayor del crecimiento micelial (Cuadro 1). La formación de halos de inhibición en aislados bacterianos se ha evidenciado en confrontaciones directas con *B. cereus* X16 contra *F. roseum* (Sadfi *et al.*, 2002). Los halos de inhibición de crecimiento por acción de los aislados CBRM17 y CBMT51 en *F. equiseti* mostraron apariencia blanquecina, con delimitación cuadrangular del hongo. Esta actividad también se observó en *Colletotrichum gloeosporioides*, por acción de *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003). La zonas delimitadas por los aislados frente a los hongos se deben a la producción de metabolitos antifúngicos, difusibles en el medio de cultivo (Sadfi *et al.*, 2002). Estos metabolitos antifúngicos podrían ser lipopéptidos cíclicos, como surfactina, iturina A y fengicina, que actúan como agentes de biocontrol contra *Fusarium* (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Inhibición en la germinación de conidios por filtrados bacterianos

Los aislados CBRM17, CBMT2 y CBMT51 cumplieron con los criterios establecidos para este experimento y los promedios de halo de inhibición en

Presence and size of inhibition halo

The analysis of variance of the inhibition halos showed significant differences between the 16 bacterial isolates ($p \leq 0.05$). Halos generated in both *Fusarium* species were of 1.30 to 6.10 mm. In *F. equiseti* ITCF1 the isolates CBRM17 and CBMT51 were different to the rest of the isolates ($p \leq 0.05$), because they generated the largest inhibition halos (5.72 and 6.10 mm). In *F. solani* ITCF2 only the CBRF15 isolate generated an inhibition halo of 1.30 mm, but it was not the bacteria with the greatest inhibition of mycelial growth (Table 1). The formation of the inhibition halos in bacterial isolates has been evident in the direct contrast of *B. cereus* X16 against *F. roseum* (Sadfi *et al.*, 2002). The growth inhibition halos due to the CBRM17 and CBMT51 isolates in *F. equiseti* showed whitish appearance, with quadrangular delimitation of the fungus. This activity was also observed in *Colletotrichum gloeosporioides*, by action of *B. subtilis* and *B. licheniformis* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003). The areas bounded by isolates against fungi are due to antifungal metabolites production, which are diffusible in the culture medium (Sadfi *et al.*, 2002). These antifungal metabolites may be cyclic lipopeptides, as surfactin, iturin A and fengicyn, acting as biocontrol agents against *Fusarium* (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Inhibition on conidia germination by filtered bacteria

CBRM17, CBMT51 and CBMT2 isolates met the criteria set for this test. The average inhibition halo of *F. equiseti* exceeded 3.0 mm. But the CBRF8 isolate was determined because of its ICR activity in both phytopathogenic species. Bacterial filtered inhibited between 42.25 and 100 % conidia germination of *F. equiseti*, and for *F. solani* the averages were from 12.75 to 100 % (Table 2). The filtering with the highest antifungal capacity was that of the isolated CBRF8, for it inhibited a 100 % of the conidia germination of both fungus species (Figure 1). The 100 % effectiveness was also observed on *Colletotrichum musae*, exposed to filtered *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*; although, it formed swellings and distortions in the conidia and germ tubes of the fungus. Similar activity was not observed in that study (Mahadtanapuk *et*

F. equiseti fueron superiores a 3.0 mm. Pero el aislado CBRF8 se determinó por su actividad ICR en ambas especies fitopatógenas. Los filtrados bacterianos inhibieron 42.25 a 100 % la germinación de conidios de *F. equiseti*, y en *F. solani* los promedios fueron 12.75 a 100 % (Cuadro 2). El filtrado con capacidad antifúngica mayor fue del aislado CBRF8, pues inhibió 100 % la germinación de conidios de ambas especies de hongo (Figura 1). La efectividad de 100 %, también se observó en *Colletotrichum musae*, expuesto a filtrados de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*; aunque en su caso se formaron hinchamientos y distorsiones en conidios y en tubos germinativos del hongo. La actividad similar no se observó en ese estudio (Mahadtanapuk *et al.*, 2007). Los filtrados del aislado CBRF8 son candidatos para controlar la actividad antifúngica, al superar en 40 % la efectividad de filtrados de *B. subtilis* aplicados en conidios de *Aspergillus flavus* (Zhang *et al.*, 2010), y 63 % a los provenientes de *Bacillus* sp. en conidios de *C. gloesporioides* (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003). El aislado bacteriano CBRF8 no mostró formación de halos de inhibición en las cepas fúngicas evaluadas, pero la capacidad antifúngica de su filtrado puede asociarse con la producción de proteínas con actividad enzimática o de toxinas que en conjunto causan cambios estructurales somáticos de los hongos y en la viabilidad de los conidios (Basurto-Cadena *et al.*, 2010). Estos pueden afectar el crecimiento total de

Cuadro 2. Inhibición de germinación de conidios (%) de *Fusarium equiseti* y *F. solani* por filtrados bacterianos a 10 h de exposición.

Table 2. Conidia germination inhibition (%) of *Fusarium equiseti* and *F. solani* by bacterial filtered after 10 h exposure.

Aislados	<i>F. equiseti</i> ITCF1	<i>F. solani</i> ITCF2
CBRF8	100 ± 0.0 a [†]	100 ± 0.0 a
CBRM17	69.50 ± 5.80 b	3.50 ± 1.00 d
CBMT2	49.25 ± 5.62 c	12.75 ± 2.06 c
CBMT51	42.25 ± 9.03 c	15.50 ± 0.58 b
Testigo	0.00 ± 0.0 d	0.00 ± 0.0 e
DMS	11.83	2.30

[†]Medias con letra distinta son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). DMS: Diferencia mínima significativa ♦ Means with different letters are statistically significant ($p \leq 0.05$). LSD: Least significant difference.

al., 2007). CBRF8 isolated filtrates are candidates for antifungal activity control, exceeding by 40 % the effectiveness of filtered *B. subtilis* applied to *Aspergillus flavus* conidia (Zhang *et al.*, 2010), and 63 % to those from *Bacillus* sp. on *C. gloesporioides* conidia (Gutiérrez-Alonso *et al.*, 2003). The CBRF8 bacterial isolate did not showed inhibition halos in the tested fungal strains, but the antifungal capacity of the filtered may be associated to the production of proteins with enzymatic or toxic activity, which

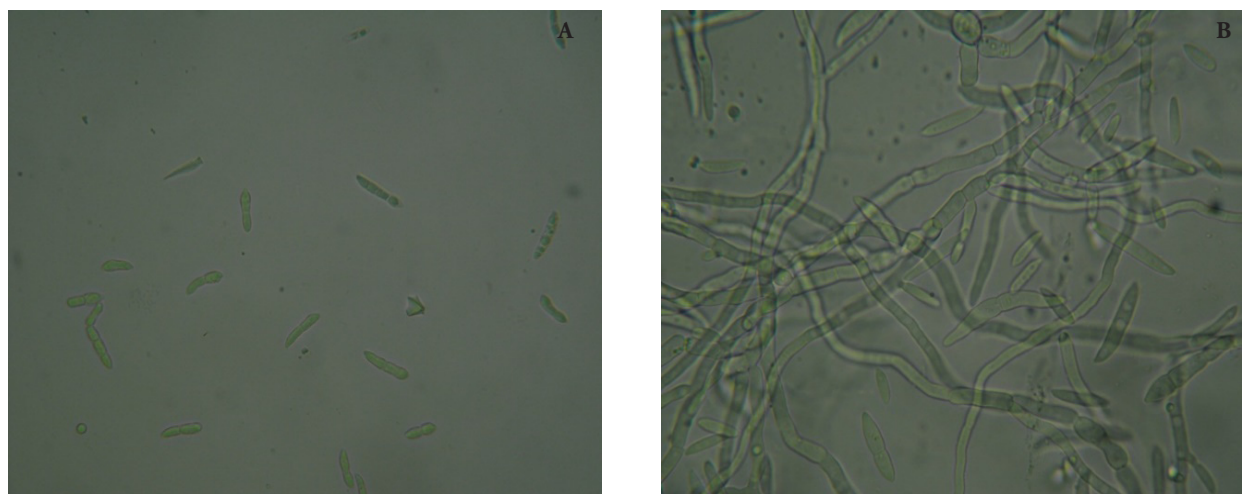


Figura 1. Inhibición de germinación de conidios de *Fusarium equiseti* por el filtrado del aislado CBRF8 después de 24 h de exposición. A, conidios tratados; B, control sin tratar (100X).

Figure 1. Conidia germination inhibition of *Fusarium equiseti* by the CBRF8 isolated filtering after 24 h of exposure: A, treated conidia; B, untreated control (100X).

los hongos o solo causar cambios morfológicos en el micelio o en sus estructuras de resistencia y reproducción (Carissimi *et al.*, 2009).

Identificación de dos aislados bacterianos antagonistas

Los aislados CBMT2 y CBMT51 fueron identificadas como *B. subtilis* (Ruiz *et al.*, 2016); por lo que en nuestro estudio se analizaron los aislados CBRF8 y CBRM17 con base en la secuencia del gen 16s rDNA. El producto amplificado por PCR mostró aproximadamente 1500 pb, y similitud de 94 y 99 % con el aislado CBRF8 con *Bacillus subtilis* (GQ214132.1) y CBRM17 con *Paenibacillus* sp. (KJ948328.1). Aunque estos aislados son de géneros diferentes, pertenecen a la misma clase Bacilli. Existe diversidad de especies de *Bacillus* antagonistas documentadas y a *B. subtilis* se le han reconocido más propiedades antifúngicas contra *Fusarium* (Guillén-Cruz *et al.*, 2006; Badía *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012a). También *Paenibacillus polymyxa*, *P. peoriae*, *P. brasiliensis*, *P. alginolyticus* y *P. favisporus* muestran actividad antifúngica contra *F. oxysporum* (Li *et al.*, 2012b; Sato *et al.*, 2014).

Detección de genes que codifican la biosíntesis de lipopéptidos antifúngicos

Solo en el aislado bacteriano CBRF8 se observaron productos de amplificación específicos, con el tamaño esperado para los fragmentos de los genes *bamC*, *ituA* y *sfp* con 875, 675 y 500 pb, respectivamente (Ramarathnam *et al.*, 2007; Berić *et al.*, 2012; Stanković *et al.*, 2012) (Figura 2). En los aislados CMBR17, CBMT2 y CBMT51 no hubo detección de esos fragmentos. Los genes detectados en el aislado CBRF8 codificaron la producción de bacilomicina D, iturina A y surfactina. La presencia de más de un gen de la síntesis de lipopéptidos, en el aislado CBRF8 de *B. subtilis*, es una característica de los aislados de este género, en los que se han obtenido 167 aislados que tienen el gen de la bacilomicina D, 111 el gen de la surfactina y 79 el gen de la iturina (Stanković *et al.*, 2012). En especies iguales y diferentes se ha detectado la presencias de genes de la bacilomicina, como en *B. cereus* DFE4, *B. amyloliquefaciens* DEF16 y BS6 y *B. subtilis* 49, el gen de la fengicina en *B. subtilis* DFH08 y 49; aunque no

together cause somatic structural changes on the fungi and in the conidia viability (Basurto-Cadena *et al.*, 2010). These can affect the overall growth of the fungi or cause only morphological changes in the mycelium or in its resistance and reproduction structures (Carissimi *et al.*, 2009).

Identification of two isolated bacterial antagonists

CBMT2 and CBMT51 isolates were identified as *B. subtilis* (Ruiz *et al.*, 2016); so, in our study the CBRM17 and CBRF8 isolates were analyzed, based on the 16S rDNA gene sequence. The amplified PCR product was about 1500 bp, and had a 94 to 99 % similarity with the CBRF8 isolated with *Bacillus subtilis* (GQ214132.1) and CBRM17 with *Paenibacillus* sp. (KJ948328.1). Although these isolates are of different genera, they belong to the same Bacilli class. There is documented diversity of *Bacillus* antagonists, and *B. subtilis* is the one that has the most recognized antifungal properties against *Fusarium* (Guillen-Cruz *et al.*, 2006; Badía *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012a). Also *Paenibacillus polymyxa*, *P. peoriae*, *P. brasiliensis*, *P. alginolyticus* and *P. favisporus* show antifungal activity against *F. oxysporum* (Li *et al.*, 2012b; Sato *et al.*, 2014).

Detection of genes encoding antifungal lipopeptides biosynthesis

Amplified specific products were only observed in the CBRF8 bacterial isolate with the expected size for the *bamC*, *ituA* and *sfp* gene fragments of 875, 675 and 500 bp, each (Ramarathnam *et al.*, 2007; Berić *et al.*, 2012; Stanković *et al.*, 2012.) (Figure 2). In the CMBR17, CBMT51 and CBMT2 isolates there was no detection of these fragments. The detected genes in the isolated CBRF8 coded bacillomycin D production, iturin A and surfactin. The presence of more than one gene for lipopeptides synthesis in the *B. subtilis* CBRF8 isolate, is a characteristic of the isolates of this genere, in which there has been obtained 167 isolates having the bacillomycin D gene, 111 the surfactin gene and 79 the iturin gene (Stankovic *et al.*, 2012). In same and different species the bacillomicyn genes presence has been detected, as in *B. cereus* DFE4, *B. amyloliquefaciens* DEF16 and BS6 and *B. subtilis* 49, the fengycin gene in *B. subtilis*

hubo amplificación para este gen, su síntesis está asociada a la inhibición de 60 % del crecimiento de *F. graminearum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Ramarathnam *et al.*, 2007). Ésta especie presenta genes como la iturina C y D y la bacilomicina C y AB, relacionados con la inhibición de crecimiento radial, halos de inhibición e inhibición de germinación de conidios en *F. oxysporum* y *F. solani* (Chung *et al.*, 2008). Estos mecanismos de síntesis de genes de lipopéptidos, con metabolitos diversos antifúngicos o compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica, como las iturinas, surfactinas y fengicinas, pueden intervenir con la actividad antifúngica de *B. subtilis* contra fitopatógenos con origen en el suelo (Cazorla *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

Las especies de *Fusarium equiseti* y *F. solani* fueron los agentes causales de la marchitez en *C. chinense*. En la inhibición del crecimiento micelial de los hongos, el mejor antagonismo *in vitro* contra *F. equiseti* lo ejercieron los aislados *Paenibacillus* sp. CBRM17, *B. subtilis* CBMT51 y CBRF8, con 71.55, 71.23 y 65.70 %. Contra *F. solani*, el antagonismo mayor se estimó con los aislados *B. subtilis* CBRF8 y *Bacillus* sp. CBRF9 con 69.16 y 62.67 %. Solo el aislado de *B. subtilis* CBRF8 causó 100 % de inhibición de la germinación de conidios. La presencia de genes que codifican la síntesis de lipopéptidos se detectó solo con el aislado *B. subtilis* CBRF8, que presentó actividad con los genes, *bamC*, *ituA* y *sfp*; responsables de la síntesis de bacilomicina D, iturina A y surfactina, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado parcialmente por DGEST (Clave: 5067.13-P). Los autores agradecen a Alejandro García Ramírez por su apoyo técnico.

LITERATURA CITADA

- Arguelles-Arias, A., M. Ongena, B. Halimi, Y. Lara, A. Brans, B. Joris, and P. Fickers. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8: 1-12.
- Athukorala, S. N., W. G. Dilantha F., and K. Y. Rashid. 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.* 55: 1021-1032.

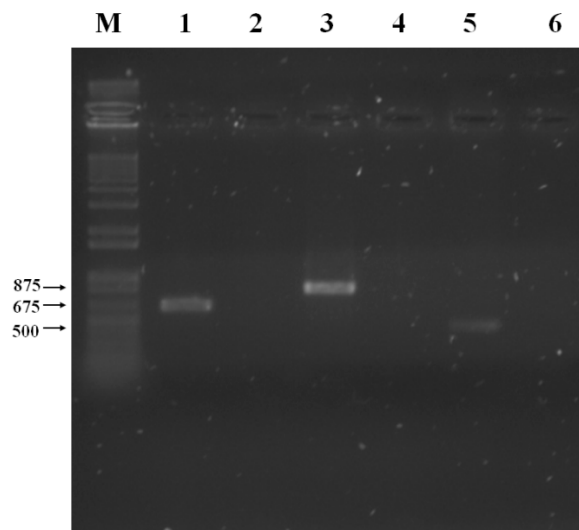


Figura 2. Amplificación por PCR de los fragmentos de los genes de biosíntesis de lipopéptidos del aislado CBRF8, con los oligonucleótidos específicos. Carril M, Marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder; Invitrogen®); carril 1, ITUD1; carril 2, FEND1; carril 3, BACC1; carril 4, ZWITR2; carril 5, SUR3 y carril 6, control negativo.

Figure 2. PCR amplification of the fragments of genes for lipopeptides biosynthesis from CBRF8 isolated, with the specific oligonucleotides. Lane M, molecular weight marker (1 kb DNA Ladder; Invitrogen®); lane 1, ITUD1; lane 2, FEND1; lane 3, BACC1; lane 4, ZWITR2; lane 5 SUR3; lane 6 negative control.

DFH08 and 49; although there was no amplification for this gene, its synthesis is associated with 60 % growth inhibition of *F. graminearum* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Ramarathnam *et al.*, 2007). This species presents iturin C and D genes and bacillomycin C and AB, related to radial growth inhibition, inhibition halos and inhibition of conidial germination in *F. oxysporum* and *F. solani* (Chung *et al.*, 2008). These mechanisms of lipopeptide synthesis genes with antifungal metabolites or compounds of various peptide and lipopeptide nature, such as iturins, fengycins and surfactins, can interfere with the antifungal activity of *B. subtilis* against phytopathogens originated in the ground (Cazorla *et al.*, 2007).

- Badía, M. R., B. Hernández T., J. A. Murrel L., J. Mahillon, y M. Pérez H. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. Bras. Agroecol. 6: 90-99.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1999. Illustrate Genera of Imperfect Fungi, Fourth Edition. Burgess Publishing Company. Minnesota. pp. 118-132.
- Basha S., and K. Ulaganathan. 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Curr. Sci. 82: 1457-1463.
- Basurto-Cadena, M. G., M. I. Font San Ambrosio, J. García-Jiménez, y M. Vázquez-Arista. 2010. Cambios en la estructura celular durante la actividad antagónica de *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia Solani* y *Fusarium verticillioides*. Acta Microscópica 19: 138-144.
- Berić, T., M. Kojić, S. Stanković, L. Topisirović, G. Degrassi, M. Myers, and D. Fira. 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria. Food Technol. Biotechnol 50:25-31.
- Carissimi, M., G. M. Schipani, J. C. Germani, and S. T. Van Der Sand. 2009. Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris sorokiniana*. Biociências 17: 48-58.
- Cazorla, F. M., D. Romero, A. Pérez-García, B. J. Lugtenberg J., A. D. Vicente, and G. Bloemberg. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. J. Appl. Microbiol. 103: 1950-1959.
- Cochrane, S. A. and J. C. Vederas. 2014. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: A gold mine of antibiotic candidates. Med. Res. Rev. 36: 4-31.
- Chung, S., H. Kong, J. S. Buyer, D. K. Lakshman, J. Lydon, S. D. Kim, and D. P. Roberts. 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80:115-123.
- Delong E. F. 1992. Archaea in Coastal Marine Environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. pp: 5685-5698.
- Escalona, Y., D. Rodríguez, y N. Contreras. 2006. Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del municipio Jiménez estado Lara, Venezuela. Rev. Bioagro 18: 3-13.
- Espinoza, M. E. B., S. G. Mir L., y M. Amaro. 2011. Hongos asociados al grano de trigo sembrado en áreas del centro de México. Rev. Mex. Fitopatol. 29: 175-177.
- Ezziyyani, M., C. Pérez S., M. E. Requena, L. Rubio, y M. E. Candela. 2004. Biocontrol por "*Streptomyces rochei*" - Ziyani -, de la podredumbre del pimiento ("*Capsicum annuum* L.") causada por "*Phytophthora capsici*". An. Biol. 26: 69-78.
- Gond, S. K., M. S. Bergen, M. S. Torres, and J. F. White, 2015. Endophytic *Bacillus* spp. produces antifungal lipopeptides and induces host defense gene expression in maize. Microbiol. Res. 172: 79-87.
- Guillén-Cruz, R., F. D. Hernández-Castillo, G. Gallegos-Morales, R. Rodríguez-Herrera, C. N. Aguilar-González, E. Padrón-Corral, and M. H. Reyes-Valdés. 2006. *Bacillus* spp. as biocontrol in an infested soil with *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn, and *Phytophthora capsici* Leonian, and its effect on development and yield of pepper crop (*Capsicum annuum* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 24: 105-114.

CONCLUSIONS

Fusarium equiseti and *F. solani* species were the causative wilting agents in *C. chinense*. In the fungi mycelial growth inhibition, the best *in vitro* antagonism against *F. equiseti* was exerted by *Paenibacillus* sp. CBRM17, *B. subtilis* CBMT51 and CBRF8 isolates, with 71.55, 71.23 and 65.70 %. Against *F. solani*, the highest antagonism was estimated with *B. subtilis* CBRF8 and *Bacillus* sp. isolated. CBRF9 with 69.16 and 62.67 %. Only the *B. subtilis* CBRF8 isolate caused 100 % inhibition of conidial germination. The presence of genes encoding the synthesis of lipopeptides was detected only with the *B. subtilis* CBRF8 isolated, which presented activity with, *bamC*, *ituA* and *sfp* genes responsible for the synthesis of bacillomycin D, iturin A and surfactin, respectively.

—End of the English version—

-----*-----

- Gutiérrez-Alonso, J. G., O. Gutiérrez A., D. Nieto A., D. Téliz O., E. Zavaleta-Mejía, F. Delgadillo S., y H. Vaquera H. 2003. Evaluación *in vitro* de Agentes Biológicos y Físicos para el Control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Rev. Mex. Fitopatol. 21: 199-206.
- Ivić, D., A. M. Domijan, M. Peraica, T. Miličević, and B. Cvjetković. 2009. *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean, and pea grain in Croatia. Arch. Ind. Hyg. Toxicol. 60: 435-442.
- Li, H., X. Wang, M. Han, Z. Zhao, M. Wang, Q. Tang, C. Liu, B. Kemp, Y. Gu, S. Shuang, and Y. Xue. 2012a. Endophytic *Bacillus subtilis* ZZ120 and its potential application in control of replant diseases. Afr. J. Biotechnol. 11: 231-242.
- Li, P., L. Ma, Y. L. Feng, M. H. Mo, F. X. Yang, H. F. Dai, and Y. X. Zhao. 2012b. Diversity and chemotaxis of soil bacteria with antifungal activity against *Fusarium* wilt of banana. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39: 1495-1505.
- Liu, D., L. Pearce, G. Lilley, S. Coloe, R. Baird, and J. Pederesen. 2002. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. J. Med. Microbiol. 51: 117-122.
- Mahadtanapuk, S., M. Sanguansersri, R. W. Cutler, V. Sardud, and S. Anuntalabhochai S. 2007. Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus* spp. Am. J. Agric. Biol. Sci. 2: 54-61.
- Martínez, M. A., M. C. Martínez, P. Bielza, J. Tello, and A. Lacasa. 2011. Effect of biofumigation with manure amendments and repeated biosolarization on *Fusarium* densities in pepper crops. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38: 3-11.

- Mojica-Marín, V., H. A. Luna-Olvera, C. F. Sandoval-Coronado, B. Pereyra-Alfárez, L. H. Morales-Ramos, N. A. González-Aguilar, y O. G. Alvarado-Gómez. 2009. Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) por *Bacillus thuringiensis*. *Phyton. Rev. Int. Bot. Exp.* 78: 105-110.
- Mora, I., J. Cabrefiga, and E. Montesinos. 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *Int. Microbiol.* 14: 213-223.
- Montano, M., Y. Duarte, and B. Martínez. 2012. *Fusarium* species identified from soil and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Granma, Cuba. *Rev. Prot. Veg.* 27:213.
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. F. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Edit. The Pennsylvania State University. pp. 85-95, 143-150.
- Novaes, S., M. De Resende, e P. Paiva. 2005. Efeito de diferentes fungicidas e de resistencia na inibicao do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.p. *gladioli* e comparacao de metodologias de inoculacao em bulbos. *Sum. Phytopathol.* 31: 371-373.
- Orberá, R. T. M., M. J. Serrat D., y Z. González G. 2009. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Rev. Fitosanidad* 13: 95-100.
- Radzhabov, U. R., and K. Davranov. 2010. Metabolites of *Bacillus subtilis* SKB 256, growth inhibitors of phytopathogenic fungi. *Chem. Nat. Compd.* 46: 160-162.
- Ramarathnam, R., S. Bo, Y. Chen, W. G. Fernando, G. Xuewen, and T. de Kievit. 2007. Molecular and biochemical detection of fengycin-and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Can. J. Microbiol.* 53:901-911.
- Roberti, R., A. Veronesi, and F. Flamigni. 2012. Evaluation of microbial products for the control of zucchini foot and root rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1. *Phytopathol. Medit.* 51:317-331.
- Romano, A., D. Vitullo, M. Senatore, G. Lima and V. Lanzotti. 2013. Antifungal Cyclic Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Strain BO5A. *J. Nat. Prod.* 76: 2019-2025.
- Rubio-Reque, G. L., F. M. Baltodano-Sánchez, L. I. Abanto-Campos, J. H. Wilson-Krugg, and M. A. Muñoz-Ríos. 2008. Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-T y Homai-WP. *Rebiol* 28: 1-12.
- Ruiz-Sánchez, E., M. A. Mejía-Bautista, A. Serrato-Díaz, A. Reyes-Ramírez, Y. Estrada-Girón, and A. J. Valencia-Botín. 2016. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. *Agrociencia* 50: 133-148.
- Ruiz-Sánchez, E., M. A. Mejía-Bautista, J. Cristóbal-Alejo, A. Valencia-Botín, y A. Reyes-Ramírez. 2014. Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Rev. Mex. Cien. Agric.* 5: 1325-1332.
- Sadfi, N., M. Cherif, M. R. Hajlaoui, A. Boudabbous, and R. Belanger. 2002. Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Ann. Microbiol.* 52: 323-338.
- Sanzón-Gómez, D., G. Valdovinos-Ponce, R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, M. Avilés, and L. Guevara-Olvera. 2012. Morphological changes in cells of chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 30: 66-71.
- SAS Institute. 2010. User's Guide: Statistics, version 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, North Caroline, USA.
- Sato, I., S. Yoshida, Y. Iwamoto, M. Aino, M. Hyakumachi, M. Shimizu, and S. Tsushima. 2014. Suppressive potential of *Paenibacillus* strains isolated from the tomato phyllosphere against *Fusarium* crown and root rot of tomato. *Microbes Environ.* 29: 168-177.
- Sarti, G., C y S. S. Miyazaki. 2013. Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia* 47: 373-383.
- Sosa-Pech, M., E. Ruiz-Sánchez, M. Mejía-Bautista, A. Reyes-Ramírez, J. Cristóbal-Alejo, A. Valencia-Botín, y O. Gutiérrez-Alonzo. 2012. Actividad antagonista *in vitro* de aislados de la clase Bacilli de la Península de Yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. *Universidad y Ciencia* 28: 279-284.
- Stanković, S., S. Mihajlović, V. Draganić, I. Dimkić, G. Vukotić, T. Berić, and D. Fira. 2012. Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. *Arch. Biol. Sci.* 64: 1425-1432.
- Villanueva-Arce, R., C. A. Aguilar-Pompa, Y. de las M. Gómez-Gómez, G. Valencia-Toro, A. B. Piña-Guzmán, y S. Bautista-Baños. 2013. Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*). *Agrociencia* 47: 691-705.
- Vásquez-López, A., B. Tlapal-Bolaños, M. J. Yáñez-Morales, R. Pérez-Pacheco, y M. Quintos-Escalante. 2009. Etiología de la marchitez del 'chile de agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32: 127-134.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. (eds). Academic Press, San Diego, CA. pp. 315-321.
- Zainudin, N. A. I. M., S. Nordahliauwate, N. A. Johari, A. A. Razak, and B. Salleh. 2011. Isolation and identification of *Fusarium* species associated with *Fusarium* ear rot disease of corn. *Pertanika. J. Trop. Agric. Sci.* 34: 325-330.
- Zhang, D. J., R. F. Liu, Y. G. Li, L. M. Tao, and L. Tian. 2010. Two new antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. *Chem. Pharm. Bull.* 58: 1630-1634.