

Programa Institucional  
de Maestría en  
**Ciencias**  
Biológicas

# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Aislamiento y caracterización de bacterias antagónicas a *Fusarium* sp.  
y evaluación de la capacidad de control del patógeno en planta.

TESIS

Que presenta:

ING. BRENDA ARACELI SALMERÓN SANTIAGO

Para obtener el grado de:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directora de tesis  
Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas

Co-directora de tesis  
Dra. Ma. del Carmen Orozco Mosqueda

Uruapan, Michoacán., agosto 2023

## Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

---

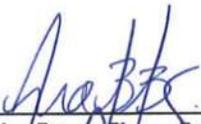
**DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS**  
**COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**P R E S E N T E**

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ANTAGÓNICAS a *Fusarium* sp. Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CONTROL DEL PATÓGENO EN PLANTA" presentado por la ING. Brenda Araceli Salmerón Santiago con Número de Matrícula D104791A, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
Morelia, Michoacán, a 15 de agosto de 2023

**COMITÉ SINODAL**



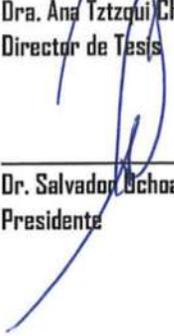
---

Dra. Ana Tztzqui Chavez Bárcenas  
Director de Tesis



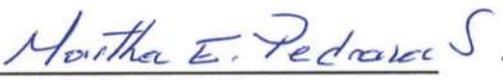
---

Dra. Ma. Del Carmen Orozco Mozqueda  
Co directora



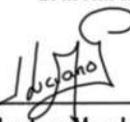
---

Dr. Salvador Ochoa Ascencio  
Presidente



---

Dra. Martha Elena Pedraza Santos  
Vocal I



---

Dr. José Luciano Morales García  
Vocal 2

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo 787921 otorgado para la realización de esta investigación.

A mi asesora de tesis la **Dra. Ana Tztzqui Chávez Bárcenas**, encargada de laboratorio de Interacciones Planta Ambiente (IPA) de la Facultad de Agrobiología; por su apoyo académico para llevar a cabo este trabajo, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y compartir sus conocimientos, por guiarme y apoyar siempre en todo lo que necesite durante mi estancia en su laboratorio.

A mi co asesora **Dra. Ma. Del Carmen Orozco Mosqueda** por su disponibilidad para desarrollar la investigación.

A mis asesores, **Dr. Salvador Ochoa Ascencio**, **Dra. Martha Elena Pedraza Santos** y el **Dr. José Luciano Morales García**, por su paciencia y disponibilidad al facilitarnos instalaciones y material para la realización de algunos ensayos; así como sus correcciones y consejos para enriquecer el desarrollo de la investigación.

Al **Dr. Isaac Alejandro Salmerón Santiago** por su apoyo, sus conejos y su guía durante mi estancia en el laboratorio de Interacciones Planta Ambiente (IPA).

A mi compañero y amigo **Ing. Froylán Navarro Álvarez**, por siempre estar presente cuando necesite, por brindarme su ayuda incondicional cada que lo requerí, y por sostener mi espalda en todo momento.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio **Priscila Maritza Martínez García**; **Diana Isela Ávila Jacobo**; **Jorge Luis Navarro Montoya**, **Axel Brandon Uribe Barreto** y **Ana Arredondo Castillo**, por su invaluable ayuda y compañerismo; por sus hazañas reconstruyendo el invernaderito y por darme siempre un motivo para reír y levantarme el ánimo, por apreciar y recibir de la misma forma a mi hijo, todos tienen un espacio en mi corazón y en el de Ale.

A todos porque sin su apoyo la culminación de este trabajo no habría sido posible.

## DEDICATORIAS

A mi hijo **Alejandro** por esperar y posponer días de juego y paseos con tal de verme terminar mi trabajo, sé que fue difícil para ti también ¡pero lo logramos!

A mis hermanos **Laura e Isaac** por apoyarme en mis decisiones.

A mi tía **Mari** por cuidarme a la distancia y sostenerme cuando sentía que no podía continuar.

A mi amigo **Isaac Acuña**, por cuidarme y ayudarme siempre a reconocer mi valor.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
<b>El género <i>Fusarium</i></b> .....	<b>5</b>
<b>Taxonomía y morfología</b> .....	<b>6</b>
<b>Métodos de control de la marchitez por <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	<b>8</b>
Control cultural.....	8
Control químico.....	10
Control biológico de <i>Fusarium</i> sp. ....	11
<b>Las plantas y su interacción con microorganismos</b> .....	<b>12</b>
<b>Bacterias promotoras de crecimiento vegetal</b> .....	<b>13</b>
Mecanismos directos de las PGPB .....	14
Producción de sideróforos .....	14
Producción de ácido indolacético .....	16
Mecanismos indirectos de las PGPB.....	17
Producción de antibióticos.....	18
Actividad quitinolítica .....	18
Resistencia Sistémica Inducida .....	19
Actividad proteasa .....	20
<b>Bioprospección de microorganismos edáficos en suelos nativos y agrícolas.</b> ....	<b>22</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>25</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>Obtención del material biológico</b> .....	<b>26</b>
Colecta de suelo para la obtención de PGPB .....	26
Obtención de aislados de <i>Fusarium</i> spp. ....	26
Obtención de cultivos puros de aislados de <i>Fusarium</i> spp. ....	27
Microcultivo para la observación de estructuras fúngicas .....	28
Almacenamiento de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. ....	29
<b>Aislamiento y descripción morfológica de bacterias edáficas con potencial antagónico a <i>Fusarium</i> sp.</b> .....	<b>29</b>
Aislamiento de bacterias edáficas .....	29
Criopreservación de los aislados bacterianos .....	30
Activación de los aislados bacterianos en medio líquido (suspensión bacteriana) .....	30
Eliminación de los aislados bacterianos con capacidad hemolítica .....	31
Tinción de Gram .....	31
Morfología colonial.....	31

<b>Selección de bacterias edáficas con potencial antagónico confrontadas con diferentes aislados de <i>Fusarium</i> sp.</b> .....	<b>32</b>
Prueba preliminar de antagonismo.....	32
<b>Caracterización molecular de bacterias edáficas con potencial antagónico</b> .....	<b>32</b>
<b>Selección de aislados de <i>Fusarium</i> sp. y planta modelo para establecimiento del bioensayo (pruebas de patogenicidad)</b> .....	<b>34</b>
Prueba de patogenicidad en plantas de zarzamora, arándano y aguacate .....	34
Evaluación de los daños del hongo a las plantas.....	35
Aislamiento de <i>Fusarium</i> sp. de las raíces de las plantas de <i>Rubus</i> sp.....	36
Prueba de patogenicidad en plantas de tomate .....	36
<b>Prueba de antagonismo dual</b> .....	<b>37</b>
Curva de crecimiento bacteriano .....	37
Confrontaciones duales con las bacterias seleccionadas .....	38
<b>Mecanismos de promoción</b> .....	<b>39</b>
Actividad proteasa .....	39
Actividad quitinolítica .....	39
Degradación de celulosa .....	40
Solubilización de fosfatos .....	40
Producción de sideróforos.....	41
Producción de AIA.....	41
<b>Establecimiento de bioensayo en plantas de tomate</b> .....	<b>42</b>
Evaluación de los daños en las plantas de tomate.....	43
Análisis estadísticos .....	44
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>Obtención de cultivos monospóricos de <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	<b>45</b>
<b>Aislamiento y descripción morfológica de bacterias edáficas con potencial antagónico a <i>Fusarium</i> sp.</b> .....	<b>46</b>
Aislamiento de bacterias edáficas .....	46
Selección de aislados bacterianos no hemolíticos .....	46
Caracterización de los aislados bacterianos seleccionados.....	47
Selección de aislados bacterianos con potencial antagónico a <i>Fusarium</i> .....	50
<b>Caracterización molecular de bacterias edáficas con potencial antagónico</b> .....	<b>53</b>
<b>Identificación de mecanismos antifúngicos y de promoción del crecimiento vegetal por los aislados bacterianos</b> .....	<b>54</b>
Patrón de crecimiento de los aislados bacterianos .....	57
<b>Selección de material biológico evaluar el efecto de la confrontación antagónica en planta</b> .....	<b>59</b>
Pruebas de patogenicidad en plantas de zarzamora, arándano y aguacate.....	59
Microorganismos asociados a las raíces de las plantas de <i>Rubus</i> sp. ....	61
Prueba de patogenicidad en tomate.....	62
<b>Prueba de antagonismo dual</b> .....	<b>64</b>
Confrontación dual con las bacterias seleccionadas.....	64
<b>Bioensayo en plantas de tomate</b> .....	<b>65</b>
<b>DISCUSION</b> .....	<b>68</b>

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>

## RESUMEN

Los hongos del género *Fusarium* son patógenos de plantas con una extensa distribución y un amplio rango de hospederos que incluye diversas especies de interés agrícola. El control de las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. puede lograrse a través de manejo integral en donde el control biológico y la selección de genotipos resistentes sean incluidos como componentes esenciales de la estrategia. En la última década, diversos estudios sugieren que estrategias basadas en el uso de microorganismos son capaces de reducir el desarrollo de enfermedades generadas por agentes fitopatógenos. En este trabajo se obtuvieron bacterias edáficas de suelos agrícolas que manifestaron antagonismo bajo condiciones *in vitro* contra especies del género *Fusarium*. La selección de microorganismos se realizó aplicando una presión de selección; para ello se coinoculó una suspensión de suelo proveniente de un huerto de aguacate con incidencia de daños por *Fusarium* sp. con un aislado de *Fusarium* sp. A partir de esa muestra se obtuvieron 36 aislados bacterianos, los cuales fueron descritos morfológicamente. En total se seleccionaron cinco aislados con características sobresalientes en una prueba preliminar de antagonismo, la caracterización molecular a través de la secuenciación del gen 16S ribosomal permitió identificarlas como *P. megaterium* con un 100 % de identidad. Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos de confrontación contra *Fusarium* sp. en una prueba de antagonismo dual. Interesantemente, uno de los aislados identificado como BAF 3 mostró porcentajes de 21 % de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*. Además, se realizaron pruebas bioquímicas para determinar posibles mecanismos de acción antagónica y de promoción de crecimiento vegetal, las cuales resultaron positivas para proteasa, degradación de celulosa, producción de sideróforos y de ácido indolacético (AIA). Se evaluó el potencial antagónico de BAF 3 en planta, inoculando bajo distintos tratamientos, el aislado en plántulas de tomate infectadas con un aislado de *Fusarium* sp., el cual fue seleccionado entre 6 aislados de *Fusarium* spp. a través de pruebas de patogenicidad, obteniendo un porcentaje de severidad de la enfermedad del 74.3 %. Se determinaron los parámetros de intensidad y frecuencia de la infección en la raíz de tomate a los 90 días después de la inoculación con BAF

3 y *Fusarium* sp., adaptando la metodología propuesta por Trouvelot et al., (1986). El efecto antagónico fue mayor en los tratamientos en los que se inoculó *P. megaterium* BAF3 en tomate tres y ocho días previos a la inoculación con *Fus* 6, así como al aplicar una segunda dosis de *P. megaterium* BAF3 ocho días posteriores a una co-inoculación con la bacteria y *Fus* 6. Los resultados del bioensayo sugieren que la aplicación de *P. megaterium* reduce significativamente la intensidad de infección del patógeno *Fusarium* sp. en las raíces de tomate y demuestran la presencia de bacterias capaces de exhibir acción antagónica contra *Fusarium* sp. en suelos cultivados y manejados en un sistema de producción intensiva.

### **Palabras clave**

Control biológico, PGPB, gen 16S, *P. megaterium*, pruebas de patogenicidad, infección de raíces.

## SUMMARY

*Fusarium* is a genus of plant pathogenic fungi with a broad host range including species of agronomic importance. Control of diseases caused by *Fusarium* spp. can be achieved through integrated management where biological control and the selection of resistant genotypes are included as essential components of the strategy. In the last decade, various studies suggest that strategies based on the use of microorganisms can reduce the development of diseases caused by phytopathogenic agents. In this work, edaphic bacteria from agricultural soils that manifested antagonism against species of the *Fusarium* genus were obtained. A soil suspension from an avocado orchard with *Fusarium* sp. damage, which was co-inoculated with an isolate of *Fusarium* sp. and 36 bacterial isolates were obtained, which were morphologically described. Of these isolates, five with outstanding characteristics were selected in a preliminary antagonism test, they were molecularly characterized through 16S ribosomal gene sequencing, and later confronted with *Fusarium* sp. in a dual antagonism test, obtaining an isolate that could inhibit 21% mycelial growth of *Fusarium* sp., the isolate was phylogenetically related to *Priestia megaterium*. In addition, biochemical tests were carried out to determine mechanisms of antagonistic action and promotion of plant growth; showing protease activity, cellulose degradation; production of siderophores and indoleacetic acid (IAA). The antagonistic potential of BAF 3 in the plant was evaluated, inoculating under different treatments, the isolate in tomato seedlings infected with a *Fusarium* sp. isolate, which was selected among 6 *Fusarium* spp. isolates. through pathogenicity tests, obtaining a percentage of severity of the disease of 74.3%. Intensity and frequency parameters of tomato root infection were determined 90 days after inoculation with BAF 3 and *Fusarium* sp., adapting the methodology proposed by Trouvelot et al., (1986). The antagonistic effect was greater in the treatments in which BAF3 (*P. megaterium*) was inoculated on tomato three and eight days prior to the inoculation with *Fus 6*, as well as when applying a second dose of *P. megaterium* BAF3 eight days after a co-inoculation. inoculation with the bacterium and *Fus 6*. The results of the bioassay suggest that the application of *P. megaterium* significantly reduces the intensity of infection of the pathogen *Fusarium* sp. in tomato

plants and demonstrate the presence of bacteria capable of exhibiting antagonistic action against *Fusarium* sp. in cultivated and managed soils in an intensive production system.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### El género *Fusarium*

Los hongos del género *Fusarium*, es uno de los grupos de hongos patógenos causantes de enfermedades en plantas, son organismos que se distribuyen en diversos ambientes como suelos agrícolas, silvícolas y cultivos intensivos bajo invernadero. *Fusarium* spp. tienen una permanencia prolongada en los suelos, ya que son saprófitos facultativos y sobreviven en agua casi por tiempo indefinido, gracias a la formación de clamidosporas. Estos organismos son causantes de pudrición en tallos y enfermedades vasculares en muchas plantas de interés agronómico (Agrios, 2005). Dos de las especies de este género, *F. graminearum* y *F. oxysporum*, figuran dentro de las 10 especies de mayor importancia económica a nivel mundial (Dean et al., 2012).

*Fusarium* spp. puede llegar a ser un serio problema sanitario ya que los hongos de este género producen metabolitos tóxicos (micotoxinas y fitotoxinas) peligrosos para el humano, los animales y las plantas (Sumalan et al., 2013). Las enfermedades ocasionadas en plantas desencadenan en el hospedero una serie de síntomas generalmente de carácter irreversible, incluyendo pardeamiento vascular, epinastia foliar, retraso del crecimiento y marchitez progresiva, originando pérdidas económicas cuantiosas (Agrios, 2005).

En México, la SAGARPA (2017) incluyó 38 cultivos agrícolas dentro del Plan Nacional Agrícola 2017-2030, por la importancia económica que representan; como ejemplo se encuentran cultivos básicos y con potencial de mercado como trigo, maíz, caña de azúcar, agave, aguacate, algodón, fresa, zarzamora, tomate entre otros. La explotación comercial de estos cultivos conlleva el manejo de problemas fitosanitarios, entre los que se ha reportado la marchitez asociada a hongos del género *Fusarium* (Mariscal et al., 2017; Martínez-Fernández et al., 2015 & Ramírez-Ramírez et al., 2017;).

## Taxonomía y morfología

Los hongos del género *Fusarium* son un complejo que comprende organismos patógenos y no patógenos; que poseen una amplia gama de hospederos, habiendo una estrecha relación entre la cepa patógena y el hospedero, llevando a los fitopatólogos a introducir el término *forma specialis*, el cual agrupa las cepas con un mismo rango de hospederos, además se identifican razas en algunas *forma specialis*, relacionando su capacidad de infección en distintos genotipos del mismo hospedero (Edel-Hermann & Lecomte, 2019).

La taxonomía para este género es bastante compleja y ha sufrido diversos cambios desde las primeras descripciones en 1809 (Summerell, 2019).

Por ejemplo, en el último análisis sobre la biología y taxonomía de *Fusarium oxysporum* realizado en el año 1980, Edel-Hermann & Lecomte (2019) reportan 79 *forma specialis*, además de la existencia de razas en 16 de esas formas. Desde entonces el conocimiento de los rangos de hospederos de *F. oxysporum* ha aumentado considerablemente. Hasta el momento se han encontrado 106 *forma specialis* de *Fusarium oxysporum* bien caracterizadas, 37 más sin evidencia suficiente y 58 hospederos que no han sido clasificados dentro una *forma specialis*.

Phylum: *Ascomycota*

Clase: *Sordariomycetes*

Orden: *Hypocreales*

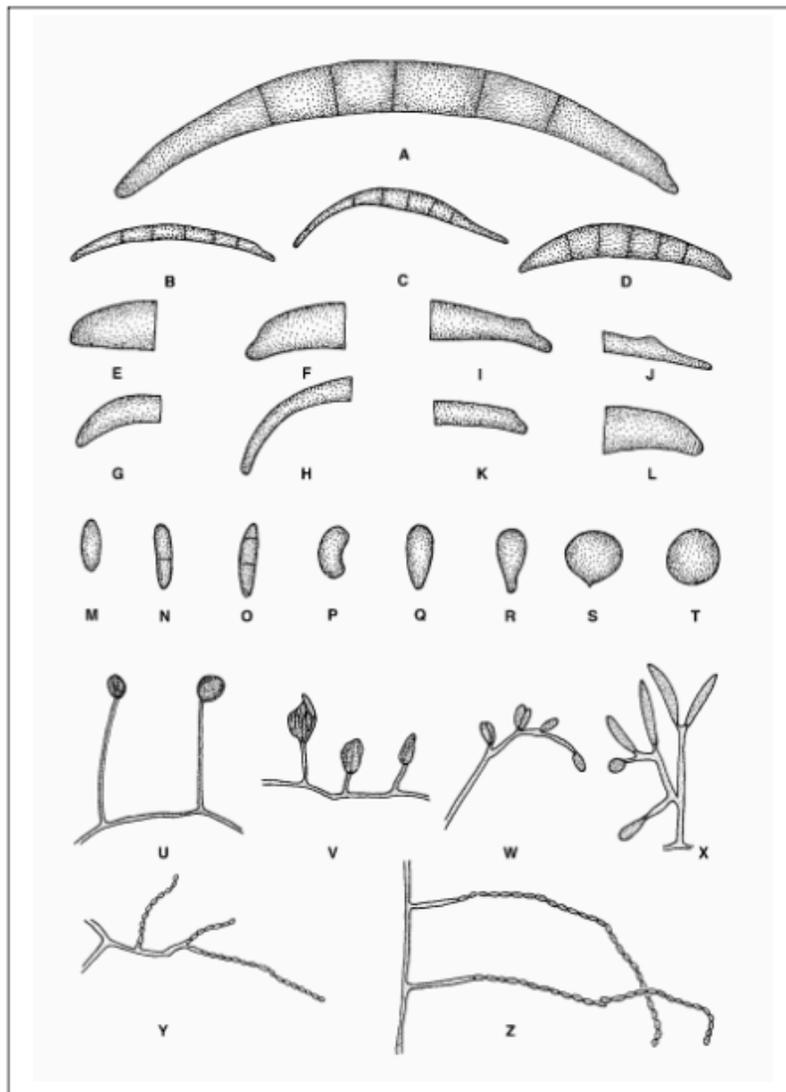
Familia: *Nectriaceae*

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium* spp.

EPPO, 2023.

Algunas características morfológicas generales que corresponden a este género son las siguientes; los macroconidios son la característica más importante, ya que en muchos casos la morfología de la misma es suficiente para la identificación a nivel de especies, presentan forma de medialuna y pueden ser hialinos o septados, la forma de las células apicales de los macroconidios puede presentar formas romas, papilas, en forma de gancho y cónicas como lo describe Leslie & Summerell en su publicación *The Fusarium Laboratory Manual* (Figura 1). La célula basal o pie tiene cuatro formas generales; pie alargado, con muescas distintivas y con muescas escasas (Leslie & Summerell, 2006)



**Figura 1. Características morfológicas usadas en la identificación de *Fusarium* spp. A-D: formas de macroconidios.** A. macroconidio típico, célula apical en el extremo izquierdo, célula basal en el extremo derecho. B. macroconidios delgado y recto. D. Macroconidios con el lado dorsal más curvado que el lado ventral. **E-H: Formas de las células apicales de los macroconidios.** E. Roma. F. Papilada. G. Gancho. H. Cónica. **I-L. Forma de la célula basal de macroconidios.** I. Forma de pie. J. Forma de pie elongado. K. Notoriamente dentada. L. Apenas dentada. **M-T. Formas de microconidios.** M. Oval. N. bicelular. O. tricelular. P. Reniforme. Q. ovoide con base trunca. R. Piriforme. S. Napiforme. T. Globoso. **U-X. Morfología de fiálides.** U y V. Monofiálide. W y X. Polifiálide. **Y-Z. Cadenas de microconidios.** Y. cadenas cortas. Z. Cadenas largas. Adaptada de Leslie y Summerell (2006).

No todas las especies presentan microconidos, por lo que su presencia es un carácter importante para la identificación, así como el número de septos que pueden ser 0-1, aunque algunas especies pueden producir 2 septos (Leslie & Summerell, 2006). Las formas de microconidio pueden ser ovalada, reniforme, ovoide, piriforme, napiforme, globosa y fusiforme, una sola especie puede producir microconidios con más de una forma (Leslie & Summerell, 2006).

Las células conidiógenas son de dos tipos básicos: monofiálide o polifiálide, la diferencia se debe al número de aberturas por célula a través de las cuales se producen los conidios. La longitud de las células conidiógenas también es importante, diferenciándose como largas y cortas (Leslie & Summerell, 2006).

Los microconidios pueden disponerse en las fiálides individualmente, en cadenas, o en cabezas falsas. La longitud de las cadenas observadas puede variar desde unas pocas esporas hasta patrones muy largos. Las clamidosporas pueden formarse solas, dobles, en grupos y en cadenas, suelen tardar más de seis semanas en producirse (Leslie & Summerell, 2006).

### **Métodos de control de la marchitez por *Fusarium* spp.**

#### Control cultural

Entre las estrategias empleadas para el tratamiento de síntomas de *Fusarium* spp. resaltan las medidas preventivas, que van enfocadas a evitar la dispersión del patógeno y a reducir la incidencia del mismo en los cultivos (Ajillogba & Babalola, 2013).

La rotación de cultivos es una práctica cultural empleada en el control de la enfermedad, que consiste en plantar una serie de cultivos no relacionados en una misma área e intercalarlos por temporadas de producción. Esta práctica reduce la cantidad de inóculo en el suelo, pero para un control efectivo se deben de eliminar completamente los restos de plantas infectadas (Ajilogba & Babalola, 2013).

Fan et al. (2020) demostraron la eficacia de esta práctica al reducir la incidencia de marchitez por *Fusarium* spp. en cultivos de banano rotando el cultivo con pimiento, caña de azúcar y calabaza. Observaron que todas las estrategias de rotación condujeron a una disminución en la incidencia de la enfermedad con un aumento en los rendimientos de la producción de banano.

Dentro del control cultural de *Fusarium* spp. se ha empleado la solarización del suelo, la cual consiste en colocar un plástico sobre el suelo durante varias semanas, permitiendo la desinfección al aumentar la temperatura del suelo y la generación de vapor, debido a la irradiación solar y a que el vapor se retiene y acumula por el plástico; esta práctica ha mostrado ser eficaz para esterilizar un suelo hasta por tres años y se utiliza especialmente en condiciones de invernadero (Ajilogba & Babalola, 2013). La implementación de la solarización ha mostrado beneficios en la reducción de la presencia de *Fusarium* spp. Por ejemplo, Matheron y Porchas (2010) realizaron un experimento comparativo entre parcelas solarizadas y no solarizadas en plantas de lechuga afectadas por *F. oxysporum* f. sp. *lactucae*. La incidencia de síntomas de enfermedad por *Fusarium* spp. se redujo en un rango de 42 % a 91 % en parcelas solarizadas en un periodo de 2-8 semanas en las que el suelo alcanzó temperaturas de 47 °C - 49 °C.

El control de *Fusarium* spp. también se puede realizar usando genotipos vegetales resistentes. A la fecha ésta es considerada la medida más eficaz para el control de *Fusarium* spp., sin embargo, no existen genotipos vegetales resistentes a todas las razas y genotipos del patógeno lo que dificulta su control a través de esta estrategia (Pirgozliev et al., 2003).

## Control químico

Cuando el manejo preventivo de *Fusarium* spp. no es adecuado, y el hongo se establece en los cultivos, la mayoría de los métodos de control cultural resultan ineficaces, de tal forma que el uso de productos químicos se vuelve imprescindible (Akköprü y Demir, 2005).

Song et al. (2004) probaron 7 fungicidas *in vitro* para evaluar su eficacia en el control de *Fusarium* spp. obteniendo como resultado que los fungicidas procloraz a una concentración de 0.4 mg/mL y carbendazim a una concentración de 5 mg/mL inhibieron el crecimiento micelial y presentaron un efecto preventivo del 69 % y de 87 % respectivamente. Los autores concluyen que estos fungicidas pueden controlar de manera eficiente la enfermedad cuando se aplican en la concentración adecuada.

Una de las desventajas del uso de fungicidas es que ha favorecido el surgimiento de microorganismos patógenos altamente resistentes a las sustancias químicas aplicadas para su control, lo que conduce al desarrollo de enfermedades fungosas con mayor grado de patogenicidad en los cultivos (Villa-Martínez et al., 2014, García-Gutiérrez & Rodríguez-Meza, 2012).

Si bien el uso de sustancias químicas ayuda en gran medida a controlar los problemas fitosanitarios en los cultivos, se deben considerar acciones preventivas, que integren los diferentes modos de control para lograr un adecuado manejo de la enfermedad (Ajilogba & Babalola, 2013).

Control biológico de *Fusarium* sp.

Hay muchas definiciones de control biológico, sin embargo, la idea principal involucra estrategias para reducir la incidencia de enfermedades o la severidad de las mismas, a través del uso de organismos o sustancias derivadas de los mismos (Nega, 2014).

Una vez que la colonización de *Fusarium* spp. en el suelo ha tenido éxito, es casi imposible eliminarlo (Dita et al., 2018), sin embargo, varios estudios han informado que el manejo integral de la enfermedad incluyendo el control biológico es más efectivo que usando únicamente agentes de control biológico (Dita et al., 2018).

Dentro de los microorganismos más promisorios como agentes de control biológico se han encontrado hongos del género *Trichoderma* y bacterias de diferentes géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Nega, 2014 & Xue et al., 2015).

Pan et al. (2015), seleccionaron endófitos bacterianos aislados de granos de trigo y evaluaron su capacidad antagónica frente a *Fusarium graminearum* *in vitro* y en condiciones de campo, logrando obtener cepas identificadas como *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*, las cuales redujeron significativamente el crecimiento del hongo y la germinación de conidios de *F. graminearum* *in vitro*; mientras que en condiciones de campo; *B. megaterium* fue la más efectiva reduciendo la incidencia de *F. graminearum*, así como a severidad de la enfermedad en 93 y 54 %, respectivamente.

Syed Nabi et al. (2021), evaluaron la capacidad de *Bacillus aryabhatai* para controlar los efectos de la enfermedad de marchitamiento de tomate causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. En el ensayo *in vitro*, Además de promover el crecimiento de las plantas, *B. aryabhatai* inhibió significativamente el crecimiento del patógeno.

Tolosa-Moreno et al., (2020) probaron una selección de bacterias contra *Fusarium oxysporum* en condiciones de invernadero, en dichos ensayos destacaron cepas de

*P. fluorescens* y *Bacillus megaterium*, las cuales presentaron capacidad antagónica con un 83.3 % de control de la incidencia de marchitez vascular.

Las dificultades que genera el control de *Fusarium* spp. han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas que resulten eficaces y compatibles con sistemas de agricultura sustentable. Por lo que la investigación enfocada al control biológico es una posibilidad que se ajusta a los esquemas de manejo integrado de los patógenos, con la reducción del impacto negativo de la agricultura convencional (Pal & McSpadden 2006; Akköprü & Demir, 2005).

### **Las plantas y su interacción con microorganismos**

Las plantas establecen relaciones muy complejas con numerosos microorganismos (microbiota) dentro o fuera de los tejidos vegetales, mientras que el entorno en el que se desarrolla la planta proporciona ecosistemas específicos. Santoyo & Orozco (2020) describen a la rizosfera como “la parte del suelo que se ve influenciada por la raíz, que a su vez posee subzonas conocidas como: endorizósfera (zonas del tejido de la raíz e incluyen la endodermis y las capas corticales), el rizoplano (superficie de la raíz donde se adhieren las partículas del suelo y microorganismos) y la ectorizosfera (parte del suelo que se encuentra inmediatamente adyacente a la raíz)”. De esta forma, cada cultivo o especie de planta en particular proporciona un ecosistema único (Berlec 2012; Delitte et al., 2021).

Las comunidades microbianas que habitan estos nichos ecológicos interactúan con las plantas a través de diversos mecanismos (Berg et al., 2020). Las plantas, a través de la rizodeposición, exudan moléculas que actúan como señales químicas y como fuente de carbono y otros elementos esenciales que permiten el establecimiento de comunidades diversas, resultando así un microbioma particular para cada condición de suelo o relacionado a cultivo (Banerjee et al., 2017; Compant et al., 2005).

Algunos microorganismos de la rizosfera pueden estimular el crecimiento de la planta, incrementar el rendimiento, reducir la infección por patógenos, así como también reducir el estrés biótico o abiótico (Compant et al., 2010).

## **Bacterias promotoras de crecimiento vegetal**

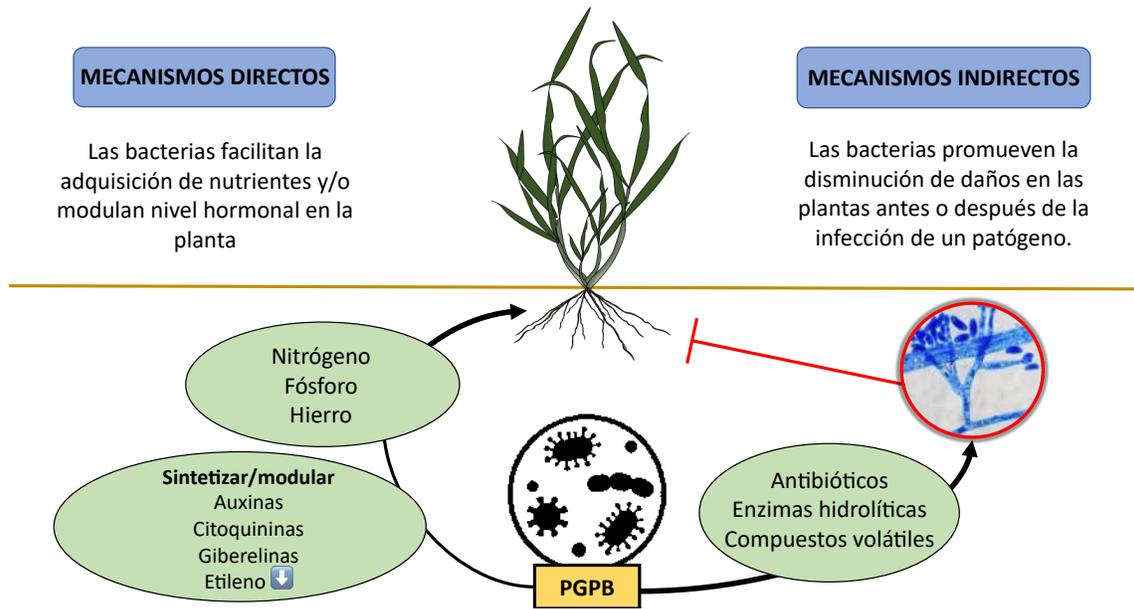
Uno de los componentes importantes de la rizosfera son las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) o rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR). Son todas aquellas bacterias que habitan la rizosfera y ejercen un papel benéfico, estimulador o protector de las plantas (Orozco-Mosqueda & Santoyo, 2020).

Las interacciones entre las plantas y las bacterias pueden ser benéficas, dañinas o neutras para la planta. Las PGPR establecen relaciones benéficas con las plantas; comúnmente se encuentran en la rizosfera, adheridas a la superficie de la raíz (rizoplano). Esta localización típica de las bacterias refleja el hecho de que la mayoría de las plantas proveen metabolitos derivados de foto asimilados que los microorganismos usan como fuente de energía (Glick, 2020).

Las PGPB pueden estimular el crecimiento de las plantas, aumentar rendimiento de los cultivos, reducir infección por patógenos, así como disminuir los efectos del estrés biótico o abiótico (Banerjee et al., 2017; Berg et al., 2020).

Se pueden distinguir mecanismos directos e indirectos a través de los cuales las PGPB favorecen el crecimiento o la salud vegetal. Los mecanismos directos son aquellos que influyen en el desarrollo vegetal, a través de una interacción directa entre la bacteria y la planta, de este modo una bacteria considerada PGPB puede facilitar la adquisición de nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo y hierro. Por otro lado, pueden estimular el nivel de hormonas vegetales dentro de la planta, sintetizando hormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas o disminuir la síntesis de etileno (Gamalero & Glick, 2011).

Mientras que los mecanismos considerados indirectos son aquellos en los cuales la bacteria elimina o restringe el crecimiento de microorganismos patógenos, mejorando la salud de la planta y promoviendo su crecimiento. Los mecanismos indirectos incluyen la síntesis de antibióticos, compuestos orgánicos volátiles, proteasas, quitinasas, sideróforos y lipopéptidos (Dobbelaere et al., 2003).



**Figura 2. Representación de algunos de los mecanismos directos e indirectos utilizados por PGPB para facilitar el crecimiento y desarrollo de las plantas.** Modificado de Glick (2020).

### Mecanismos directos de las PGPB

Los mecanismos directos se refieren a la habilidad de las PGPB de facilitar la adquisición de nutrientes, modular el nivel de hormonas dentro de las plantas, a través de mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal, algunos de estos mecanismos se describen a continuación:

#### Producción de sideróforos

El hierro es uno de los minerales más abundantes en la corteza terrestre, y es uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos (Aguado-Santacruz et al., 2012).

A pesar de su abundancia, este elemento no está fácilmente disponible en el suelo para su asimilación. En el suelo, la mayor parte de hierro se encuentra formando silicatos de ferromanganeso, hidróxidos y óxidos de hierro, en la mayoría de los minerales primarios se encuentra como  $Fe^{+2}$  e hidróxidos de  $Fe^{+3}$  altamente insolubles y siendo condicionada su solubilidad por el pH de suelo (Aguado-Santacruz et al., 2012).

Para obtener el hierro necesario para su crecimiento y metabolismo, las bacterias de suelo sintetizan y secretan moléculas de unión al hierro de baja masa molecular (400-1000 dalton) conocidas como sideróforos (Kloepper et al., 1980; Schwyn & Neilands, 1987).

Estas moléculas se unen a  $Fe^{+3}$  con una afinidad muy alta, transportan el complejo hierro-sideróforo de regreso a la célula bacteriana donde es absorbido por medio de una membrana celular externa, y luego se pone a disposición para el crecimiento bacteriano (Compant et al., 2005; Leong, 1986).

Los PGPB facilitan el crecimiento de las plantas, al sintetizar sideróforos que se unen a una gran parte del  $Fe^{+3}$  que está presente en la rizosfera de la planta huésped, evitando que los patógenos fúngicos y bacterianos en las inmediaciones de las raíces de la planta huésped, donde se une el PGPB de biocontrol, obtengan suficiente hierro para su crecimiento, de modo que no puedan proliferar y actuar como patógenos debido a la falta de hierro (Compant et al., 2005; Glick, 2020).

Se ha demostrado que los PGPB productores de sideróforos previenen la proliferación de fitopatógenos. Kloepper et al., 1980 fue el primero en describir la importancia de la producción de sideróforos como un mecanismo de control biológico, en un ensayo *in vitro* con *Pseudomonas fluorescens-putida* (productora de sideróforos), la cual fue crecida en dos condiciones; por un lado, utilizando un medio complementado con  $FeCl_3$  y por otro lado un medio sin la adición de  $FeCl_3$ . Con lo que pudo observar la acción de antibiosis de *P. fluorescens* contra *Erwinia carotovora* en el medio sin  $FeCl_3$  demostrando que la acción de antibiosis fue condicionada por la ausencia de hierro, además, la producción de sideróforos se dió en el medio ausente del elemento.

A diferencia de los fitopatógenos, las plantas generalmente no se ven afectadas por el agotamiento localizado de hierro en el suelo causado por los sideróforos producidos por el biocontrol PGPB. Esto se debe a que la mayoría de las plantas pueden crecer en concentraciones de hierro mucho más bajas que la mayoría de los microorganismos. Además, muchas plantas pueden absorber el complejo de

hierro-sideróforo, transportarlo a través de la planta y luego liberar de forma reductora el hierro de sideróforo bacteriano para que la planta pueda utilizarlo (Compant et al., 2005).

La capacidad de los sideróforos para actuar como agentes “supresores de enfermedades” efectivos se ve afectada por la planta de cultivo el particular, el fitopatógeno específico que se suprime, la composición de suelo (incluidos los nutrientes y los microorganismos), la bacteria que sintetiza el sideróforo y la afinidad de sideróforo específico. Todas estas posibles variables sugieren que, aunque un PGPB de biocontrol en particular es un agente supresor de enfermedades efectivo en el laboratorio, su comportamiento en el campo puede ser mucho más difícil de predecir (Compant et al., 2005; Sajeed Ali & Vidhale, 2013).

#### Producción de ácido indolacético

La mayoría de las actividades fisiológicas de una planta están reguladas por una o más hormonas vegetales (fitohormonas) que incluyen auxina, citoquinina, ácido abscísico, etileno, ácido salicílico, ácido jasmónico y brasinoesteroides (Kende & Zeevaart, 1997). Además de las plantas, muchas bacterias del suelo también son capaces de sintetizar y/o modular el nivel de algunas de estas hormonas, incluidas la auxina, la citoquinina, la giberelina y el etileno (Egamberdieva et al., 2017).

El papel de AIA bacteriano en las interacciones entre microorganismos y plantas destaca el hecho de que las bacterias usan esta fitohormona para interactuar con las plantas como parte de su estrategia de colonización (Gamalero & Glick, 2011 y Spaepen et al., 2007).

Las auxinas participan en la respuesta de crecimiento de raíces y brotes a la luz y la gravedad, la diferenciación de tejido vascular, la dominancia apical, la iniciación de raíces laterales y adventicias, la estimulación de la división celular y la elongación de tallos y raíces. Además, al aflojar las paredes celulares de las raíces de las plantas (como parte de su efecto sobre el alargamiento de las células), el AIA aumenta significativamente la cantidad de exudados de las raíces, lo que altera la

diversidad y la actividad de las bacterias rizosféricas de las plantas (Ahemad y Kibret, 2014).

Un porcentaje muy grande de bacterias de la rizosfera sintetiza AIA, esto probablemente se debe a que la biosíntesis de AIA es un componente esencial (o al menos muy importante) de funcionamiento y metabolismo de estas bacterias, posiblemente tanto para la promoción de crecimiento de las plantas como para otras funciones (Gamalero y Glick, 2011). Muchas bacterias de suelo tienen una gran afinidad por el triptófano (típicamente el precursor bioquímico de AIA), lo que les permite consumir el triptófano de medio ambiente incluso cuando hay niveles muy bajos disponibles (Ahemad y Kibret, 2014).

La identificación de intermediarios de la biosíntesis de AIA en bacterias condujo a la identificación de cinco vías metabólicas diferentes, las cuales usan triptófano como precursor (Ahemad y Kibret, 2014 y Gamalero y Glick, 2011). La vía del indol-3-acetamida (IAM); la ruta de indol-3-piruvato (IPyA); la ruta de la triptamina (TAM); vía de la oxidasa de la cadena lateral de triptófano (TSO) y la vía de indol-3-acetonitrilo (IAN) (Ahemad y Kibret, 2014).

La vía más caracterizada en bacterias es la vía de indol-3-acetamida. Conforme a lo descrito por Ahemad y Kibret (2014), en esta vía de dos pasos, el triptófano se convierte primero en IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (IaaM), codificada por el gen *iaaM*. En el segundo paso, IAM se convierte en AIA mediante una hidrolasa IAM (IaaH), codificada por el gen *iaaH*.

#### Mecanismos indirectos de las PGPB

En general los mecanismos indirectos de las PGPB se relacionan con la acción de biocontrol que dichos microorganismos promueven en los nichos en donde se encuentran. Algunos de ellos son a través de la competencia por nutrientes, resistencia sistémica inducida y la producción de metabolitos antifúngicos, a continuación, se describen algunos de estos mecanismos.

## Producción de antibióticos

Se han identificado varios antibióticos producidos por *Pseudomonas*, entre ellos anfisina, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), cianuro de hidrógeno, oomicina A, fenazina, pioluteorina, pirrolnitrina, tensina, tropolona y lipopéptidos cíclicos; así como oligomicina A, kanosamina A y xantobacina producidas por *Bacillus*, *Streptomyces* y *Stenotrophomonas* spp. (Compant et al., 2005).

La síntesis de antibióticos está relacionada con el estado metabólico de la célula, que a su vez este dictado por la disponibilidad de nutrientes y otros estímulos ambientales como minerales disponibles, tipo de fuente y suministro de carbono, pH, temperatura (Compant et al., 2005).

Las condiciones bióticas también pueden influir en la biosíntesis de antibióticos. Además, el crecimiento y desarrollo de las plantas influye en la producción de antibióticos. El genotipo de la planta huésped también juega un papel importante en la interacción supresora de enfermedades de la planta con un agente microbiano de control biológico (Compant et al., 2005).

## Actividad quitinolítica

La quitina existe en tres formas cristalinas: a-, b- y g- quitina, que difieren en la disposición de cadenas poliméricas, otorgándoles diferentes propiedades mecánicas. Las diferentes cadenas se entrecruzan con otros polímeros estructurales como proteínas y b-glucanos para proporcionar rigidez y resistencia. En el ambiente, la quitina se encuentra en varios grados de desacetilación, desde la quitina completamente acetilada, hasta su forma completamente desacetilada, que se conoce como quitosano (Elieh-Ali-Komi D., 2016).

La degradación de la quitina es catalizada por las quitinasas, que se encuentran en organismos que contienen quitina, principalmente insectos, crustáceos y hongos. Además, estas enzimas también se detectan en virus, bacterias, arqueas, protistas, plantas superiores y animales (Gamalero y Glick, 2011).

Las quitinasas cumplen varias funciones en estos organismos; como en la morfogénesis, el ciclo de nutrientes y también en la defensa contra plagas y enfermedades que contienen quitina. Las bacterias quitinolíticas descomponen la quitina tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y se encuentran en una amplia gama de hábitats. En el suelo y la rizosfera, las bacterias utilizan la quitina de insectos y hongos como fuente de carbono y nitrógeno (Gamalero y Glick, 2011).

Algunas de las especies de bacterias que han exhibido producción de enzimas quitinolíticas se encuentran, especies de *Streptomyces*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Ali et al., 2018).

En géneros de PGPB como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia* se ha reportado actividad hiperparasitaria, mediante la excreción de hidrolasas de pared celular como la quitinasa, por lo que se les atribuye un rol importante en el biocontrol de patógenos fúngicos, siendo la quitina el mayor constituyente de la pared celular de los hongos (Abdullah et al., 2008 citado por Lau et al., 2020; Compant et al., 2005). En ensayos *in vitro* Huang et al. (2005) observaron que la bacteria quitinolítica *B. cereus* tuvo actividad inhibitoria sobre la germinación de conidios de *Botrytis elliptica*, un patógeno fúngico de importancia económica en la producción de flor de lirio.

#### Resistencia Sistémica Inducida

La SAR se desarrolla cuando las plantas activan con éxito su mecanismo de defensa en respuesta a la infección primaria por un patógeno, especialmente cuando este último induce una reacción de hipersensibilidad a través de la cual se limita a una lesión necrótica local de tejido marrón desecado. Algunas bacterias edáficas desencadenan un fenómeno conocido con ISR fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR). Como SAR, ISR es efectivo contra diferentes tipos de patógenos, pero se diferencia de SAR en que el microorganismo PGPB inductor no causa síntomas visibles en la planta huésped (Compant et al., 2005).

La ISR activada por PGPB fortalece la pared celular de la planta y altera la fisiología del huésped y las respuestas metabólicas, lo que conduce a una síntesis mejorada de químicos de defensa de la planta ante el desafío de patógenos y/o factores de estrés abiótico. Los cambios bioquímicos o fisiológicos en las plantas incluyen la acumulación inducida de proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas PR) como PR-1, PR2, quitinasas y algunas peroxidasas. Sin embargo, ciertos PGPB no inducen proteínas PR, sino que aumentan la acumulación de peroxidasa, fenilalanina amoníaco liasa, fitoalexinas, polifenol oxidasa y/o chalcona sintasa (Compant et al., 2005).

#### Actividad proteasa

Ya que los compuestos nitrogenados están presentes en los suelos de forma orgánica, principalmente como péptidos, la mineralización del N en los suelos requiere de la acción catalizadora de las proteasas para realizar la hidrólisis de las proteínas a polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos (Ali et al., 2018).

Las proteasas se pueden clasificar según varios criterios, incluido el tipo de reacción catalizada, el grupo funcional del sitio activo y la estructura molecular (Vranova et al., 2013). Las proteasas como las exopeptidasas catalizan la hidrólisis de los aminoácidos terminales de las cadenas polipeptídicas, mientras que las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos internos. Las exopeptidasas actúan sobre los extremos terminales C y N de las cadenas polipeptídicas. Las exopeptidasas que son capaces de eliminar uno, dos y tres aminoácidos de lado N-terminal se denominan aminopeptidasas, dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas, respectivamente (Landi et al., 2011). Las carboxil peptidasas eliminan uno y dos aminoácidos de los extremos de las cadenas peptídicas que contienen el grupo carboxilo libre en el extremo C-terminal (Landi et al., 2011). Las carboxipeptidasas se dividen en carboxipeptidasas de tipo serina, metalocarboxipeptidasas y carboxipeptidasas de tipo cisteína, según el mecanismo catalítico empleado. Las endopeptidasas se reconocen de acuerdo con la naturaleza química de los grupos responsables de la actividad catalítica (Landi et al., 2011) y se dividen en cuatro clases distintas: serina, cisteína, aspártico y

metaloendopeptidasas (Landi et al., 2011). Además, se distingue una quinta clase de endopeptidasas que opera con mecanismos catalíticos desconocidos, o que no encajan claramente en uno de los cuatro grupos. Las endopeptidasas se caracterizan además en función de su pH óptimo catalítico, es decir, ácido, neutro o alcalino (Vranova et al., 2013).

Las proteasas en el suelo se originan a partir de varias fuentes diferentes, incluidos microorganismos, plantas, excrementos de animales, materia orgánica en descomposición, la importancia de estas fuentes varía según el tipo de ecosistemas y el manejo aplicado al suelo (Landi et al., 2011).

La mayoría de los microorganismos de suelo expresan actividades proteolíticas. Las proteasas microbianas clave incluyen serina endopeptidasas tales como serina peptidasas alcalinas, peptidasas similares a subtilisina y subtilisinas de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. (Vranova et al., 2013).

Los microorganismos de suelo producen proteasas para reciclar la materia orgánica del suelo, asegurando así la nutrición microbiana (Landi et al., 2011). Las proteasas también desempeñan un papel en las interacciones de los organismos de suelo a través de la escisión de las proteínas de pared celular. Estos incluyen proteasas antifúngicas de origen bacteriano y serina proteasas alcalinas (por ejemplo, VCP1) de bacterias y hongos nematófagos o entomopatógenos. Además, la serina proteasa queratinolíticas de diferentes bacterias y hongos de suelo juegan un papel importante en el reciclaje de residuos queratinosos (Vranova et al., 2013).

La producción de proteasas por los microorganismos de suelo es constitutiva o inducible durante diferentes fases de crecimiento. Allison & Macfalane (1990) estudiaron los factores fisiológicos y nutricionales que regulan la síntesis de proteasas y concluyeron que ésta se produce al final del crecimiento activo y durante la fase estacionaria de la cinética de crecimiento del organismo, también concluyeron que la síntesis de proteasas está inversamente relacionada con la tasa de crecimiento en exceso de glucosa, por otro lado, la adición de amoníaco, fosfato y

algunos aminoácidos (triptófano, prolina, tirosina e isoleucina) reprime fuertemente la síntesis de la misma.

### **Bioprospección de microorganismos edáficos en suelos nativos y agrícolas.**

Las condiciones ambientales influyen en la diversidad de las comunidades microbianas y a su vez en la actividad metabólica del microbioma en el suelo. Por ejemplo, suelos silvícolas perturbados por incendios tienden a mostrar un incremento en la población de bacterias Grampositivas que se asocian con modificaciones del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Además, la mayoría de las prácticas agronómicas del monocultivo, como el uso de fertilizantes, plaguicidas y herbicidas también impactan de manera directa en la biodiversidad de microorganismos presentes en el suelo, disminuyendo sus interacciones metabólicas con la planta (Chávez-Bárcenas et al., 2020).

Algunos estudios comparativos muestran la diversidad de rizobacterias promotoras de crecimiento asociadas a cultivos agrícolas; así como también a plantas no cultivadas o desarrolladas de manera silvestre. Por ejemplo, de la Torre-Hernández et al., (2020) compararon las características de las PGPR entre plantas de *Echinocactus platyacanthus* y *Neobuxbaumia polylopha* tanto en las cultivadas, como en las silvestres. Demostraron que las bacterias aisladas de plantas que crecen en ambientes silvestres presentan mejores características como promotoras del crecimiento que las de los ambientes cultivados. Concluyen que las especies de rizobacterias asociadas con plantas silvestres son metabólicamente más activas, además de que estos nichos son fuente para la bioprospección de microorganismos con potencial biotecnológico.

Por otro lado, se ha descrito que algunos suelos cultivados presentan características de supresión de enfermedades ligadas a los componentes biológicos que contienen. Esta propiedad, además está ligada a los ciclos de monocultivo a los que estos suelos están sometidos. Mendes et al. (2011) analizaron la propiedad de supresión de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* en un suelo monocultivado con remolacha azucarera. Los autores describen que la supresión del suelo está

asociada con la abundancia de proteobacterias, y de manera específica a miembros de la familia *Pseudomonadaceae* que contienen genes asociados a la producción de lipopéptidos, los cuales funcionan como inhibidores del crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. Adicionalmente, los autores sugieren que plantas que se desarrollan en suelos monocultivos son capaces de reclutar especies de microorganismos para promover la protección ante patógenos.

Las condiciones ambientales que moldean la abundancia y diversidad de microorganismos presentes en el suelo son la temperatura, textura, pH, concentración de sales, tipo de suelo, tipo de cultivo (si es un suelo cultivado), entre las más importantes. Estas características en el suelo también están influenciadas por la interacción que existe entre el suelo y el sistema radicular de la planta, de tal manera que dicha interacción puede generar una selección de microorganismos adaptados a un ecosistema particular (Appuhn y Joergensen, 2006; Bais et al., 2006)

Es por ello, que en la bioprospección de microorganismos con características metabólicas particulares es importante explorar suelos con distintas características, como aquellos en donde se desarrollan plantas silvestres, en los que se han establecido monocultivos y suelos con características especiales en los que se sugiere pueden existir microorganismos adaptados de manera específica a la rizosfera de plantas de interés agronómico.

## JUSTIFICACIÓN

Los hongos del género *Fusarium* se puede encontrar en casi todas las regiones climáticas. Las especies de *Fusarium* poseen un amplio rango de hospederos y afectan a diferentes cultivos agrícolas a nivel mundial. Por ejemplo, Fontagro.org (2021) reporta la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, en plátano como una de las enfermedades más devastadoras, ocasionando pérdidas anuales de 388 millones de USD en Indonesia, Taiwán y Malasia que son las principales regiones productoras. Otro ejemplo es lo reportado por Gordon et al. (2016) quienes mencionan la presencia de *Fusarium oxysporum* en zarzamora, registrando incidencias del 10% al 40 % en zonas productoras de California. En México, la secadera de la fresa es el principal problema fitosanitario de este cultivo, causando pérdidas de hasta el 50 % de la producción en el estado de Guanajuato, los agentes causales son al menos 14 especies de hongos, siendo *Fusarium oxysporum* el más frecuente (Mariscal et al., 2017).

Esta problemática deriva en el uso de fungicidas como método de control, con el costo medio ambiental y daños a la salud humana que esto implica. Por ello, realizar la búsqueda de microorganismos antagónicos de fitopatógenos como *Fusarium* spp. en suelos de la región, constituyen una herramienta con potencial como componente de un programa de manejo integrado para cultivos de interés agronómico.

## HIPÓTESIS

Bacterias edáficas seleccionadas por su capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Fusarium* spp. tienen uso potencial como agentes de biocontrol del patógeno *in vivo*.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Aislar y seleccionar bacterias edáficas tolerantes a la presencia de *Fusarium* sp. *in vitro* con capacidad de control de la marchitez por *Fusarium* en plantas.

### Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar morfológica, bioquímica y genéticamente los aislados de bacterias con capacidad antagónica a hongos del género *Fusarium*.
- Seleccionar un modelo vegetal para el estudio de la capacidad antagónica de los aislados bacterianos a *Fusarium* spp.
- Evaluar el efecto de las bacterias aisladas sobre el desarrollo de la planta modelo en presencia de *Fusarium* spp.

## MATERIALES Y METODOS

### Obtención del material biológico

Colecta de suelo para la obtención de PGPB

El suelo para el aislamiento de los microorganismos antagónicos se obtuvo del huerto de aguacate “El agostadero” ubicado en Tancítaro, Michoacán (coordenadas 19°15′42.7” N; 102°24′49.6” W). De acuerdo con SEMARNAT (2014) este sitio “se encuentra a 1,550 msnm, el clima predominante es semicálido subhúmedo con abundantes lluvias en verano, la temperatura media anual varía de 8°C a 18°C y los extremos oscilan entre 6.5 y 22°C. La precipitación pluvial va de 800 a 1200 mm<sup>3</sup> anuales, el tipo de suelo es andosol úmbico (Anu), suelo que presenta una porción relativamente alta de hierro y aluminio en la fracción de tierra fina y una alta retención de fosfatos hasta una profundidad de 35 cm, es de consistencia untuosa y una textura franco-limosa o muy fina y no se satura de agua en ninguna época del año” (CONANP, 2014)

El huerto tiene árboles de aproximadamente 10 años, plantados en marco real y la distancia entre árboles es de 7 m; presenta zonas con árboles con síntomas severos de marchitamiento, junto a los cuales hay árboles aparentemente sanos.

El suelo se colectó de la zona de goteo, de tres árboles sin síntomas de marchitez, adyacentes a tres árboles con síntomas de marchitez, generando un total de tres muestras de suelo. Para tomar la muestra se excavó a 30 cm de profundidad en la zona de goteo de cada árbol, la cual se dividió en cuatro cuadrantes y se colectaron 250 g de suelo de cada cuadrante, generando una muestra compuesta de 1 kg de suelo por árbol.

Obtención de aislados de *Fusarium* spp.

Los aislados del género *Fusarium* spp. utilizados (para la selección de bacterias antagónicas) pertenecen al cepario del laboratorio de Fitopatología II de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” a cargo de Dr. Salvador Ochoa Ascencio y fueron obtenidos de cultivos de aguacate en Michoacán y Nayarit, así como de otros

cultivos como zarzamora, arándano y mango, colectados en el estado de Michoacán (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Procedencia de los aislados de *Fusarium* spp.** Cada aislado fue identificado con una clave (*Fus*), seguido de un número consecutivo, se muestra el hospedero, síntoma que presentaba la planta de donde se obtuvo el material para su aislamiento y el origen de la muestra.

Aislado	Hospedero	Síntoma	Origen
<i>Fus</i> 1	Aguacate	Pudrición de raíz	Jicalán, Mich.
<i>Fus</i> 2	Aguacate	Pudrición de raíz	Ario de Rosales, Mich.
<i>Fus</i> 3	Mango	Malformación de inflorescencia	J. Mujica, Mich.
<i>Fus</i> 4	Aguacate	Cancro de ramas	Xalisco, Nayarit
<i>Fus</i> 5	Arándano	Marchitez	Peribán de Ramos, Mich.
<i>Fus</i> 6	Zarzamora	Marchitez	Los Reyes, Mich.

Obtención de cultivos puros de aislados de *Fusarium* spp.

Inicialmente se llevó a cabo una prueba presuntiva para detección de bacterias en los aislados de *Fusarium* spp. con el caldo Luria Bertani (LB) con la finalidad de descartar contaminación en los aislados. Para ello, fragmentos de agar con micelio de los aislados de *Fusarium* spp. proporcionados por el laboratorio de Fitopatología II se transfirieron a una caja de Petri con medio PDA con estreptomycin (100 mg/mL); una vez crecido el hongo se procedió a realizar la prueba para detectar la posible presencia de bacterias en las cepas con el caldo Luria Bertani (LB). Se cultivó el hongo en medio de agar harina de maíz ( $17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 5-7 días, se transfirieron tres fragmentos de  $0.5 \text{ cm}^3$  de agar con micelio en un tubo de ensaye con 2 mL de caldo de cultivo Luria-Bertani (triptona,  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extracto de levadura,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NaCl,  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH, 7.2). Se dejó incubar a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 h y se monitoreó la turbidez del medio de cultivo que indica el posible crecimiento bacteriano.

Para la generación de cultivos monospóricos, los aislados de *Fusarium* spp. se cultivaron en 50 mL de medio PDB (papa, 250 g·L<sup>-1</sup>; dextrosa, 15 g·L<sup>-1</sup>) y se incubaron en agitación a 160 rpm, 28°C en oscuridad durante 48h. Se filtró el cultivo a través de una gasa triple estéril (tejido 19 x 10). El filtrado se colectó en un tubo y se centrifugó durante 2 min a 3000 rpm y a 25°C en una centrífuga. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 20 mL de agua destilada estéril.

Se tomó 100 µL de la suspensión de conidios obtenida y se generaron diluciones seriadas para cuantificar los conidios utilizando una cámara de Neubauer (0.100 mm de profundidad). Para lo cual se tomaron 10 µl de la dilución 10<sup>-3</sup> y para cargar la cámara Neubauer y se observó al microscopio óptico (DM500, Leica). Se contó el número de conidios en 10 celdas de la cámara y se calculó el promedio de conidios por mL de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} * 10,00}{\text{no. cuadros} * \text{Factor de dilución}}$$

Se generaron suspensiones de cultivos de *Fusarium* spp. con 1000 conidios·mL<sup>-1</sup>, se colocaron 10 mL de la suspensión sobre seis puntos distribuidos alrededor de una caja Petri con medio agar-agua (15 g·L<sup>-1</sup>); se generaron 3 cajas por aislado, se incubaron en oscuridad a 25°C durante 24 h, y se monitoreó la germinación de los conidios bajo un microscopio estereoscópico (EZ4, Leica). Se aislaron conidios individuales germinados y se transfirieron a medio PDA, finalmente se incubó en oscuridad a 25°C durante 7 días.

#### Microcultivo para la observación de estructuras fúngicas

Con el fin de confirmar la presencia de estructuras características de hongos del género *Fusarium* en los aislados monospóricos, se generaron microcultivos en cámaras húmedas. Se colocó en una caja de Petri un portaobjetos elevado sobre una par de varillas de vidrio, y sobre el portaobjetos un cubo de PDA de aproximadamente 0.5 cm<sup>3</sup>, con ayuda de una aguja de disección, se picó el micelio de un cultivo monospórico del hongo y con la misma se picó el borde del cubo de

agar, lo más cercano a la superficie del portaobjetos. Posteriormente, se agregaron 15 mL de agua destilada estéril en la caja, evitando mojar el portaobjetos y se incubó en oscuridad a 25 °C durante 10 días. Transcurrido el tiempo, se desmontó la cámara húmeda, se retiró el cubo de agar y se colocó una gota de azul de lactofenol sobre el hongo en crecimiento. La observación de las estructuras del hongo se realizó en un microscopio binocular (415500-0011, Primo Star) con objetivo 100X (Connell y Padgett, 1988).

Almacenamiento de los aislados de *Fusarium* spp.

El método de almacenamiento de los aislados se realizó de acuerdo con el protocolo de Leslie y Summerell (2006). Los aislados monospóricos fueron cultivados en tubos de ensaye con 2 mL de medio SNA ( $\text{KH}_2\text{OPO}_4$ , 1 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{KNO}_3$ , 1 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g·L<sup>-1</sup>; KCl, 0.5 g·L<sup>-1</sup>; glucosa, 0.2 g·L<sup>-1</sup>; sacarosa, 0.2 g·L<sup>-1</sup>; agar, 20 g·L<sup>-1</sup>); se incubaron a 35 °C durante un periodo de 14 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 2 mL de solución de glicerol al 15 % (v/v) a la suspensión de conidios e hifas y se transfirió el volumen total a un criovial de 2 mL de capacidad. Finalmente, los tubos se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron en ultra congelador a -70°C.

### **Aislamiento y descripción morfológica de bacterias edáficas con potencial antagonico a *Fusarium* sp.**

Aislamiento de bacterias edáficas

Se realizó a partir de una técnica de coinoculación desarrollada previamente en el grupo del Laboratorio de Interacciones Planta-Ambiente (Suárez, 2023). Para lo cual, se agregaron 15 mL de medio PDA (papa, 250 g·L<sup>-1</sup>; dextrosa, 15 g·L<sup>-1</sup>; agar, 15 g·L<sup>-1</sup>; pH, 7.0) en cajas Petri hasta solidificación. Posteriormente, se colocó una alícuota de 60 mL de una suspensión de conidios en 5 mL de medio PDA (con una temperatura de 45°C a 50°C); se homogeneizó la mezcla suavemente y se vertió sobre la superficie de la placa de PDA.

El suelo colectado, fue utilizado como fuente de microorganismos. Una vez homogeneizado, se suspendieron 10 g de suelo de cada muestra en 90 mL de H<sub>2</sub>O

destilada estéril, agitando por 5 min y reposando durante 1 min. A partir de esta suspensión de suelo, se generaron diluciones seriadas con factor de 10, hasta la dilución  $10^{-3}$ . Posteriormente, se transfirió una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de suelo y se sembró por extensión con varilla de vidrio en caja Petri sobre el medio preparado con PDA y *Fusarium* sp (Sanders, 2012). Los medios co-inoculados con *Fusarium* sp. y la suspensión bacteriana de suelo se incubaron en oscuridad a 25°C durante 7 días, además se consideró un testigo inoculado únicamente con *Fusarium* sp.

Las colonias bacterianas que generaron halos de inhibición en el crecimiento de *Fusarium* sp. fueron seleccionadas y transferidas por la técnica de estriado por agotamiento en placa con medio LB (triptona, 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extracto de levadura, 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NaCl, 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; agar, 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH, 7.2). Para generar cultivos axénicos de cada aislado bacteriano, se realizaron al menos tres subcultivos de colonias aisladas en medio LB sólido.

#### Criopreservación de los aislados bacterianos

A partir de un inóculo con 24 h de incubación de los aislados bacterianos en caldo nutritivo se colocaron 500  $\mu\text{L}$  en un microtubo con capacidad de 1.5 mL y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de glicerol al 50 % (v/v), se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó en ultra congelador a -70°C. Se prepararon lotes de 10 tubos para cada uno de los aislados, el procedimiento se realizó en condiciones de asepsia, con materiales esterilizados.

#### Activación de los aislados bacterianos en medio líquido (suspensión bacteriana)

Para la activación de aislados en criopreservación se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión criopreservada (previamente descongelada a 26°C) en tubos de ensaye con 3 mL de caldo nutritivo (peptona de gelatina, 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extracto de carne 3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y se incubaron a 60 rpm en un mini agitador orbital (Compact Digital, Thermo scientific), a 28°C, durante 12 h.

## Eliminación de los aislados bacterianos con capacidad hemolítica

Para descartar aislados bacterianos potencialmente patógenos de humanos, se evaluó la capacidad hemolítica de acuerdo con el protocolo de Parra-Cota et al. (2018) y se descartaron aquellos que presentaron hemólisis beta; para ello, se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana de cada aislado sobre una placa preparada con medio agar-sangre, incubando 48 h a 28°C, con tres réplicas por aislado.

## Tinción de Gram

La tinción de Gram se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Coico (2005). Se cultivaron colonias bacterianas en medio LB (triptona, 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; extracto de levadura, 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NaCl, 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; agar, 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH, 7.2) y 24 h de incubación, posteriormente se tomó una colonia bacteriana aislada con un asa bacteriológica y con ello se realizó un frotis del cultivo. Se dejó secar y posteriormente se fijó con calor, deslizando tres veces el portaobjetos sobre la flama de un mechero.

Para hacer la tinción, se cubrió el frotis con la solución de cristal violeta (cristal violeta, 2.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; alcohol etílico 95 %, 20 mL) y se incubó durante un minuto. Después se realizó un lavado con agua destilada, se escurrió y se cubrió el frotis con lugol (yodo, 1 g; KI, 2 g; en 300 mL de agua destilada) durante un minuto; se lavó de nuevo con agua destilada. Se decoloró la muestra con alcohol etílico 96°, hasta eliminar el color azul. Se lavó nuevamente con agua destilada, se escurrió y se cubrió con safranina durante un minuto; finalmente se lavó con agua destilada y se dejó secar. La observación de las bacterias se realizó en un microscopio binocular (415500-0011, Primo Star) con objetivo 100X.

## Morfología colonial

Para nombrar los aislados bacterianos con potencial antagónico a *Fusarium* se utilizó el acrónimo BAF (por bacterias antagónicas a *Fusarium*) y un número consecutivo.

Para caracterizar el fenotipo colonial de cada aislado se utilizó el criterio propuesto por Sousa et al. (2013). Para ello se realizaron cultivos de estriado por agotamiento de los aislados bacterianos en placas de Petri con agar nutritivo, se incubaron a 20 °C durante 24 h y se evaluaron variables en la morfología colonial como forma, tamaño de la colonia, elevación, textura, borde del margen, consistencia y color, generando una matriz para agrupar las colonias bacterianas según dichas características.

### **Selección de bacterias edáficas con potencial antagónico confrontadas con diferentes aislados de *Fusarium* sp.**

Prueba preliminar de antagonismo

Se prepararon cajas de Petri con 15 mL de medio PDA sobre los que se colocó otra capa de 5 mL de medio PDA (a 45-50°C) inoculado a una concentración de  $0.75 \times 10^{-6}$  conidios·L<sup>-1</sup> a partir de un cultivo monospórico activado en medio PDB. Sobre ellas se colocaron discos de 6 mm de diámetro de papel filtro Whatman No. 4 alrededor de la caja Petri y un disco en el centro. Posteriormente se colocó una gota de 10 µL de suspensión bacteriana previamente activada de cada uno de los aislados BAF a confrontar y 10 µL de caldo nutritivo en el disco del centro, como testigo. Se incubó en oscuridad a 25°C durante 5 días.

Se registró el diámetro del halo de inhibición del crecimiento del hongo alrededor de los discos de papel impregnados con los aislados bacterianos y se generó una escala para asignar un grado de inhibición en el crecimiento micelial de *Fusarium* sp., correspondiente en una escala arbitraria de 0 a 3, agrupando los diámetros que variaron de 0 hasta 1 cm.

### **Caracterización molecular de bacterias edáficas con potencial antagónico**

Para la extracción de DNA, se empleó el método de lisis alcanina (Green y Sambrook, 2016). Cada aislado se inoculó en 3 mL de caldo nutritivo y se incubó en agitación a 160 rpm a 25°C durante 24 h. Se transfirió 1 mL de cultivo bacteriano en microtubos de 1.5 mL y se centrifugó a 12,000 rpm en un centrifuga (Biofuge Pimo

R, Heraeus) durante un minuto. El paquete celular se resuspendió con 100  $\mu\text{L}$  de Solución I (Glucosa, 50 mM; Tris-HCl, 25 mM; EDTA, 10mM), agitando vigorosamente en Vortex (Genie2). Posteriormente, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de Solución II (NaOH, 0.2 N; SDS 1% v/v), la mezcla se agitó por inversión y después se incubó a 4°C durante 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de Solución III ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$  5M, 60.0 mL;  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 11.5 mL;  $\text{H}_2\text{O}$ , 28.5 mL), agitando suavemente y después las muestras se incubaron a 4 °C durante 5 min. Se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se recuperó un tubo nuevo. Después, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1; v:v) se mezcló en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y el DNA se precipitó con 1.5 volúmenes de isopropanol. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min. La pastilla se lavó con 700  $\mu\text{L}$  de etanol al 70 % (v/v) y se agitó suavemente con ayuda del vórtex, posteriormente se centrifugó a 12,000 g durante 2 min y se decantó el etanol. La pastilla se incubó a 60 °C hasta la evaporación completa del solvente y después se resuspendieron con agua con RNasa ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Con el DNA obtenido se realizó la amplificación del gen 16S rDNA mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), usando los iniciadores fD1 (5'-AGAGTTTAGTCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991) en un termociclador (Select Cycler, BIO-Products). Los iniciadores amplifican un fragmento de aproximadamente 1500 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , cada reacción contenía 6  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada; 1  $\mu\text{L}$  de DMSO, 0.5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los iniciadores diluidos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{L}$  de GoTaq® DNA Polymerase. A cada reacción se le adicionó 1  $\mu\text{L}$  de DNA a una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Como control negativo se preparó una reacción con 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada en lugar de DNA. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 min a 95 °C, seguido de 29 ciclos a 95 °C durante 30 S, 58 °C durante 30 S y 72°C por 1 min 30 S, por último 5 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron secuenciados por la empresa Psomagen y las secuencias obtenidas se compararon con los bancos de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés) para la búsqueda de homologías con las secuencias reportadas.

### **Selección de aislados de *Fusarium* sp. y planta modelo para establecimiento del bioensayo (pruebas de patogenicidad)**

Prueba de patogenicidad en plantas de zarzamora, arándano y aguacate

Con la finalidad de seleccionar el modelo biológico y el aislado de *Fusarium* sp. apropiados para establecer el bioensayo, se realizaron pruebas de patogenicidad por el método de inoculación por inmersión de raíces descrito por Cardona-Piedrahita y Castaño-Zapata (2019) con plantas de zarzamora (*Rubus* sp.) variedad kiowa; arándano (*Vaccinium* sp.) variedad biloxi, aguacate (*Persea americana*) variedad drymifolia, las plantas se consiguieron directamente en viveros comerciales y fueron inoculadas por separado con cada uno de los seis aislados de *Fusarium* spp. Para ello, las plantas se retiraron de las macetas, se lavaron las raíces con abundante agua hasta dejarlas completamente expuestas. Después se cortó aproximadamente un tercio de la raíz de cada planta y se sumergieron en una suspensión de conidios de cada aislado de *Fusarium* sp. ( $1 \times 10^6$  conidios·mL<sup>-1</sup>) durante 24 h. Posteriormente, las plantas se transfirieron a macetas de 335 mL de capacidad con perlita estéril. Se trasladaron a un espacio a campo abierto y se mantuvieron con riegos constantes de agua y la aplicación de 25 mL de solución nutritiva Long-Ashton (Hewitt y Eden, 1953) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Solución de Long-Ashton aplicada a las plantas de zarzamora, aguacate y arándano durante las pruebas de patogenicidad

Fuente elemental	Concentración milimolar	Miligramos por litro de solución
KNO <sup>3</sup>	4	404
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5	368
Ca(NO <sup>3</sup> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	4	944
NaH <sub>2</sub> PO <sup>4</sup>	1.3	160
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.01	1.69
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.002	0.25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.001	0.29
H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	0.05	3.1
NaCl	0.101	5.9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	7.10 <sup>E-05</sup>	0.088
FeC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	0.095	0.025

#### Evaluación de los daños del hongo a las plantas

Para evaluar los daños causados por los aislados de *Fusarium* spp. se estableció una escala de severidad, con base en los reportes de Asran y Buchenauer (2003) y (Khalil et al., 2021), que considera que 0 son plantas sanas; 1, clorosis con una hoja dañada; 2, clorosis, marchitamiento y bordes secos en una hoja; 3, clorosis, marchitamiento y tejido muerto presente en dos hojas; 4, clorosis, marchitamiento y tejido muerto presente en tres hojas; 5, planta muerta. Los datos fueron registrados a los 90 días después de la inoculación.

Los daños se expresaron en porcentaje de severidad de la enfermedad y se calcularon con base en la siguiente fórmula (Khalil et al., 2021).

$$\text{Severidad de enfermedad (\%)} = \frac{[\Sigma(\text{RXN})] \times 100}{H \times T}$$

En la fórmula R corresponde al nivel de la enfermedad determinado por la escala; N, número de plantas con cada uno de los niveles de la escala; H, categoría más alta registrada en la escala; T, número total de plantas.

Además, se comparó el resultado anterior con el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), con el fin de calcular la intensidad final de la enfermedad y por el tiempo que duro el experimento; para ello se tomaron registros a los 10, 30 y 90 días después de haber sido establecido el experimento, el ABCPE se calculó con lo reportado por Shaner y Finney (1977) citado por Sánchez-González et al. (2019), para lo cual se utilizó la siguiente formula:

$$ABCPE = \Sigma \left[ \left( \frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \right) (T_{i+1} - T_i) \right]$$

En la fórmula,  $Y_i$  indica la severidad de la enfermedad en el muestreo inicial;  $T_i$ , el tiempo en días después de la inoculación.

Aislamiento de *Fusarium* sp. de las raíces de las plantas de *Rubus* sp.

Se realizó el aislamiento a partir de las raíces de las plantas a los 90 días después la inoculación con el patógeno, primero se limpió la raíz retirando todos los restos del sustrato, se tomaron secciones de aproximadamente 1 cm de longitud, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial diluida al 10 % (v:v), seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, las secciones de raíz fueron colocadas en medio PDA con estreptomicina a una concentración de  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  y se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  durante 5 días. Se realizaron microcultivos de las colonias obtenidas para la observación de estructuras fúngicas.

Prueba de patogenicidad en plantas de tomate

La prueba de patogenicidad en tomate se hizo *in vitro*. Para ello, se utilizaron semillas de tomate variedad Río Grande, las cuales se desinfectaron superficialmente con solución comercial de hipoclorito de sodio diluida al 10 % (v:v); agitando vigorosamente durante 15 min y realizando 3 enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, en frascos con medio MS (Murashige & Skoog, 1962) a una dilución del 10% (v:v), con agar-agar  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . En cada frasco se colocó un disco de agar con cultivo de crecimiento micelial de *Fusarium* sp. de 4 mm de diámetro en el centro y 5 semillas de tomate distribuidas en la periferia. Se incubaron

a temperatura ambiente (19 a 26 °C) durante 8 días, bajo un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad.

Se registró la severidad de daños en la planta estableciendo una escala con base en la reportada por Cordero-Ramírez et al. (2013) y Wang y Jeffers (2000). Esta escala considera que 0 es una planta sana; 1, raíces pardas; 2, raíces pardas con ahogamiento de la planta; 3, ahogamiento de la planta y desprendimiento de raíz; 4, planta muerta. El resultado fue expresado como porcentaje de severidad de la enfermedad según la formula:

$$\text{Severidad de enfermedad (\%)} = \frac{[\Sigma(\text{RXN})] \times 100}{H \times T}$$

### **Prueba de antagonismo dual**

#### Curva de crecimiento bacteriano

Se generó un preinóculo en 3 mL de caldo nutritivo, incubado durante 12 h a 25°C en agitación continua. 500 µL del preinóculo fueron transferidos a un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 150 mL de caldo nutritivo. El matraz se colocó en un agitador orbital a 160 rpm, a 25°C durante 20 h y cada dos horas se tomó una alícuota de 1 mL del cultivo para determinar la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Hitachi 200, Perkin-Elmer). Además, se colectaron alícuotas de 500 µL del cultivo para generar diluciones seriadas desde 10<sup>-3</sup> hasta 10<sup>-9</sup> y de cada dilución se inocularon alícuotas de 20 µL en placas de agar nutritivo, para determinar el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC·mL<sup>-1</sup>). Con los datos obtenidos se generó una curva de cinética de crecimiento, determinando el tiempo de generación y la tasa específica de crecimiento según lo descrito por Maier & Pepper (2015), las cuales se utilizaron para describir el crecimiento en la fase exponencial y determinar el punto máximo de crecimiento.

La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) se calculó tanto para UFC·mL<sup>-1</sup> como para las absorbancias (ABS) registradas con la siguiente ecuación:

$$\mu = (\ln(N) - \ln(N_0)) / (t - t_0)$$

En donde; Ln, se refiere al logaritmo natural de los respectivos valores; N es la concentración final de inóculo en el momento en que se tomaron los datos (cada dos horas, durante 20 h); N<sub>0</sub>, es la concentración inicial del inóculo, el cual es calculado tanto para UFC como para ABS, para cada uno de los tiempos en los que se cuantificaron; t, es el tiempo final en el que se realizan cada una de las mediciones y T<sub>0</sub> es el tiempo inicial.

El tiempo de generación (g) se calculó con la siguiente fórmula:

$$g = \ln(2) / \mu$$

Donde Ln es el logaritmo natural multiplicado por dos y dividido por la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

Una vez calculada la tasa específica de crecimiento, se graficaron los valores obtenidos para determinar el punto máximo de crecimiento exponencial.

La predicción del crecimiento de la población bacteriana en la fase exponencial se determinó a partir de la ecuación de la pendiente de la variable ABS y se calculó el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>).

#### Confrontaciones duales con las bacterias seleccionadas

Con base en los resultados de la cinética de crecimiento, cada uno de los aislados BAF fueron cultivados hasta llegar al punto máximo de crecimiento exponencial, dado que la tasa específica de crecimiento fue diferente para cada una de las BAF, el tiempo de incubación fue variable.

La confrontación dual se llevó a cabo con base en la técnica descrita por Khalil et al. (2021). Para ello, se colocaron 74000 conidios del aislado *Fus* 6 en el centro de placas de Petri que contenía agar nutritivo; después se añadieron 5  $\mu$ L de la

suspensión bacteriana en su punto de máximo crecimiento exponencial sobre discos de papel filtro, dispuestos en cuatro bordes opuestos y a 3 cm del centro. Como testigo del crecimiento del aislado *Fus 6*, éste se colocó al centro de la placa y en los discos de papel filtro circundantes se colocaron 5 µL de caldo nutritivo. La confrontación con cada aislado bacteriano contó con tres repeticiones. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 5 días.

Para determinar el área de crecimiento del hongo en cada tratamiento, se utilizó el programa de análisis y procesamiento de imágenes ImageJ® 1.54d (Rasband, 2019). Los resultados de esta confrontación se expresaron en porcentaje de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria, respecto al testigo y se realizó un análisis de varianza con ANOVA y la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )

## **Mecanismos de promoción**

### Actividad proteasa

La actividad proteolítica fue determinada por la hidrólisis de caseína en placas que contenían medio Agar leche desnatada (digerido enzimático de caseína, 5.0 g·L<sup>-1</sup>; extracto de levadura, 2.5 g·L<sup>-1</sup>; leche desnatada en polvo, 1.0 g·L<sup>-1</sup>; glucosa, 1.0 g·L<sup>-1</sup>; agar-agar, 10.5 g·L<sup>-1</sup>), el medio fue adicionado con rojo Congo al 0.1 % (p/v) como indicador de la proteólisis de caseína. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 72 h en oscuridad. La actividad enzimática fue revelada por la formación de halos de disminución en el color rojo alrededor de las colonias.

### Actividad quitinolítica

Se preparó quitina coloidal por el método de Roberts y Selitrennikoff, 1988 (citado por Agrawal & Kotasthane, 2012). Se realizó una hidrólisis ácida con 4 g de quitina (Sigma-Aldrich) en 50 mL de HCl concentrado, manteniendo en agitación constante a 4°C durante 12 h, seguido de una neutralización en 200 mL de etanol al 95% (v/v) enfriado previamente y manteniendo en agitación a 26°C durante 12 h. Posteriormente, se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm a 4°C (Biofuge Pimo R, Heraeus). La pastilla se lavó con agua destilada estéril y se centrifugó durante 5 min

a 3000 rpm y a 4 °C, repitiendo los lavados hasta que se eliminó por completo el olor a alcohol. La quitina coloidal, se almacenó a 4 °C hasta su uso posterior.

Se inocularon 10 µL de suspensión bacteriana en cajas de Petri con medio de detección de quitinasa ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g·L<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0 g·L<sup>-1</sup>; ácido cítrico monohidratado, 1.0 g·L<sup>-1</sup>; agar, 15 g·L<sup>-1</sup>; quitina coloidal, 4.5 g·L<sup>-1</sup>; azul de bromocresol, 0.15 g·L<sup>-1</sup>; pH 4.7). Se incubaron a 28 °C durante 72 h. La actividad quitinolítica se reveló como cambio de coloración en el medio de amarillo a verde (pH 6.0 a 7.0) o azul (pH 7.4 a 8.1).

#### Degradación de celulosa

Para la determinación de la actividad celulolítica se utilizaron cajas Petri con medio CMC descrito por Hankin y Anagnostakis (1977) (carboximetilcelulosa, 10 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1 g·L<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g·L<sup>-1</sup>; agar-agar, 15 g·L<sup>-1</sup>; pH 7.0). Sobre este medio se inocularon 10 µL de suspensión bacteriana y se incubaron a 28°C en oscuridad durante 48 h.

La actividad celulolítica se reveló por la formación de halos alrededor de las colonias bacterianas, de acuerdo con Gohel et al. (2014), para lo cual se vertieron 5 mL de solución de yodo (0.133 g de KI y 0.067 g de yodo disueltos en 20 mL de H<sub>2</sub>O) sobre la caja Petri con el crecimiento bacteriano.

#### Solubilización de fosfatos

La capacidad de solubilización de fosfatos por las bacterias seleccionadas se analizó mediante el método de ensayo en placa con medio agar Pikovskaya (PVK) (glucosa, 10 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{Ca}^3(\text{PO}_4)_2$ , 5.0 g·L<sup>-1</sup>;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{NaCl}$ , 0.2 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{KCl}$ , 0.2 g·L<sup>-1</sup>; extracto de levadura, 0.5 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.002 g·L<sup>-1</sup>;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.002 g·L<sup>-1</sup>; pH 5.4) (Pikovskaya, 1984). Se inocularon 10 µL de suspensión bacteriana activa sobre el medio, se incubó a 28 °C, durante 72 h. La capacidad de solubilización de fosfatos por parte de las bacterias se observa como la formación de un halo transparente alrededor de las colonias bacterianas (por la solubilización del fosfato en el medio turbio).

## Producción de sideróforos

Para la detección de sideróforos se empleó el ensayo O-CAS descrito por (Pérez-Miranda et al., 2007), el cual usa el medio CAS preparado de acuerdo con el protocolo de Schwyn & Neilands (1987), agregándolo sobre la placa en la que han crecido las colonias bacterianas para revelar un halo translucido alrededor las colonias.

Todo el material de cristalería fue previamente lavado con HCl 6M. Los aislados bacterianos fueron cultivados en un medio mínimo de sales MM9 al 10% v:v, preparado con agua bidestilada ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; NaCl,  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , agar bacteriológico  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; pH 7), incubando a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 72 h.

Una vez crecidas las bacterias, se añadieron 5 mL de recubrimiento de medio CAS sobre las placas (cromo azurol S (CAS),  $60.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA),  $72.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico),  $30.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 1 mM de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 10 mL de HCl 10 mM y agarosa 0.9%; pH 6.8; esterilizado a  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 15 min y atemperado a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## Producción de AIA

Esta prueba se realizó de manera cualitativa a través de la revelación de la producción de AIA por el cambio de coloración en el medio, para ello se llevó a cabo la metodología propuesta por Patel et al. (2017) con el reactivo de Salkowski en su composición original ( $\text{HClO}_4$  concentrado, 142 mL;  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 250 mL;  $\text{FeCl}_3$  0.5M, 7.5 mL).

Los aislados bacterianos activos fueron inoculados en 5 mL de caldo nutritivo que contenía 0.2 % (p/v) de triptófano. Posteriormente, se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 h en agitación en un mini agitador orbital (Compact Digital, Thermo scientific), a 80 rpm, después se centrifugó a 3000 rpm (Biofuge Pimo R, Heraeus) durante 10 min y se transfirieron 0.5 mL de sobrenadante a un tubo con 1 mL de reactivo de Salkowski. La presencia de AIA se revela como una coloración rosa en el medio.

## **Establecimiento de bioensayo en plantas de tomate**

Las semillas de tomate se desinfectaron superficialmente con una solución de cloro comercial al 10 % (v: v) durante 15 min y se enjuagaron tres veces con H<sub>2</sub>O estéril, estas fueron colocadas en una charola de germinación de 98 cavidades, lavada previamente con cloro al 10 % (v: v) durante 10 min, como sustrato se utilizó materia orgánica esterilizada por tindalización durante una hora a 120 °C, tres días continuos. El almacigo se mantuvo en condiciones de invernadero durante 15 días con riegos continuos con agua destilada hasta la germinación y aparición de las primeras hojas verdaderas, para realizar la inoculación y el trasplante a macetas.

La inoculación de las plantas se hizo previo al trasplante, por el método de inmersión de raíces con conidios del aislado *Fus 6* (*Fusarium* sp. y el aislado bacteriano BAF 3 (inhibidor del crecimiento *in vitro* de *Fus 6*). Cuando se hicieron inoculaciones posteriores a la fecha de trasplante se removió un poco el sustrato, para colocar cerca de las raíces las suspensiones celulares y se volvieron a cubrir con el sustrato.

Las plantas con hojas verdaderas se retiraron del sustrato y sus raíces fueron lavadas con abundante agua hasta dejarlas completamente expuestas. Después se removió una proporción aproximada de un tercio del sistema radical de cada planta que después se sumergió durante 1 h en 10 mL de suspensiones de  $1 \times 10^6$  conidios del aislado *Fus 6* y/o  $1.4 \times 10^7$  UFC del aislado bacteriano BAF 3; para ello, se realizó la extracción de conidios como se describió para las pruebas de patogenicidad y el aislado BAF 3 fue incubado hasta su punto máximo de crecimiento exponencial.

Los tratamientos establecidos fueron los siguientes: T1, control las raíces se colocaron en agua destilada; T2, solo con BAF 3; T3, sólo con *Fus 6*; T4, BAF 3 y *Fus 6*; T5, BAF 3 y *Fus 6*, reinoculada ocho días después con  $1.4 \times 10^7$  UFC de BAF 3; T6, BAF 3 y tres días después con *Fus 6*; T7, BAF 3 y ocho días después con *Fus 6*.

Las plantas fueron transferidas a macetas de 335 mL de capacidad que contenían arena sílica esterilizada, se mantuvieron en condiciones de invernadero, con riegos

diarios de 20 a 40 mL de agua destilada según fuera necesario y se fertilizaron dos veces por semana con 20 mL de solución nutritiva Long-Ashton (Hewitt y Eden, 1953) (Cuadro 2).

#### Evaluación de los daños en las plantas de tomate

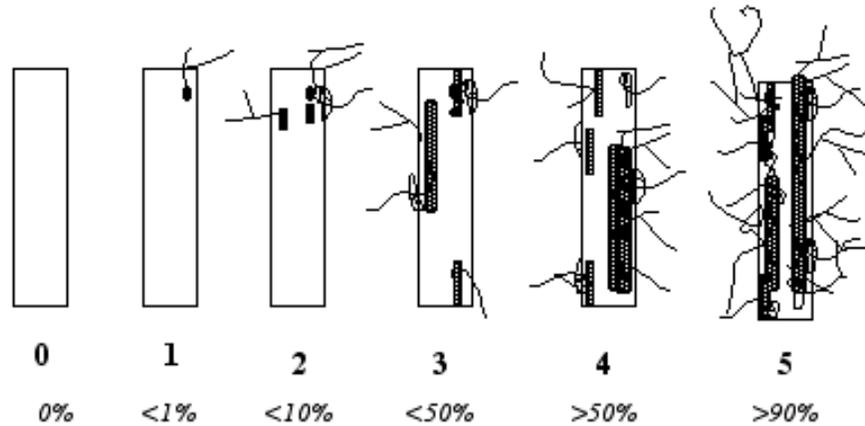
Las plantas inoculadas con microorganismos se mantuvieron e invernadero durante 90 días. Durante este tiempo, las plantas no mostraron síntomas fenotípicos evidentes de daño por presencia de *Fusarium* spp. en la parte aérea; por ello, se evaluó la presencia de colonización fúngica en las raíces.

Se colectaron raíces de tres plantas de cada tratamiento y se tiñeron para la detección de estructuras fúngicas intrarradicales utilizando el método de Phillips y Hayman, (1970) con modificaciones. Las raíces se incubaron con KOH al 10 % (p/v) a 121 °C durante 10 min. Después de decantar la solución de KOH, las raíces se enjuagaron tres veces con agua destilada y se colocaron en solución de HCL 1% (v:v) durante 1 minuto. Al finalizar, se agregó el colorante azul de tripano en acetoglicerol (27 mL de ácido acético; 33 mL de glicerol; 40 mL de agua destilada). El color se fijó en autoclave a 121°C durante 10 min.

Para estimar el porcentaje de infección se utilizó la metodología propuesta por Trouvelot et al. (1986), la cual fue desarrollada para la estimación de colonización micorrícica. Este protocolo se adaptó para estimar la frecuencia de infección (F) y la intensidad de infección (M) de *Fus 6* en las raíces.

Conforme a lo establecido en el protocolo, se montaron en portaobjetos 30 fragmentos de raíz de cada una de las tres replicas biológicas por tratamiento y se observaron en microscopio óptico (DM500, Leica) con objetivo 10X y 40X.

Se registró la frecuencia de colonización (considerada como la presencia o ausencia de estructuras de infección) y clasificando cada fragmento de acuerdo con las categorías propuestas por Trouvelot para medir la intensidad de colonización (Figura 3).



**Figura 3. Categorías propuestas por Trouvelot et al. (1986) para la estimación de colonización de hongos micorrízicos arbusculares.** Estos criterios de densidad colonial intrarradical se utilizaron para categorizar la infección de las raíces por el aislado *Fus 6*.

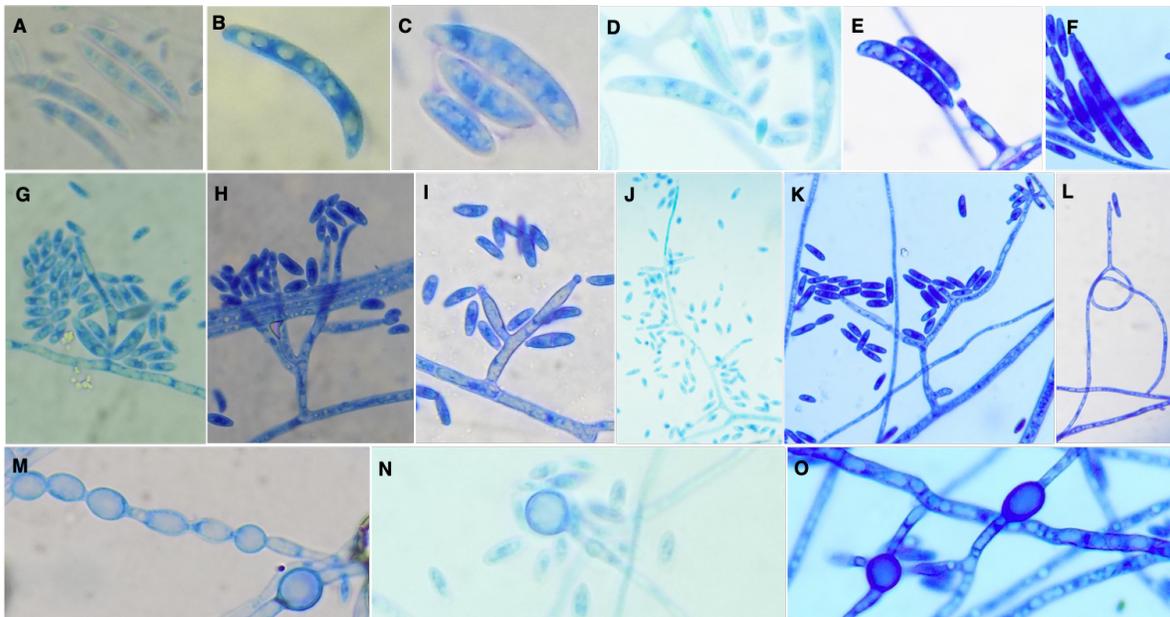
### Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa disponible en línea SAS OnDemand for Academic (SAS Institute. Inc). Para las comparaciones entre tratamientos se utilizaron tres replicas biológicas. La normalidad de los datos fue evaluada por la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianza por la prueba de Levine. Una vez comprobada la normalidad y la homogeneidad de varianzas, los datos se compararon por análisis de varianza (ANOVA), seguidos por la comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Obtención de cultivos monospóricos de *Fusarium* spp.

A partir de los seis aislados de *Fusarium* spp. (*Fus* 1 a *Fus* 6), donados por el laboratorio de Fitopatología II, se generaron cultivos monospóricos y se confirmó la presencia de estructuras morfológicas características de *Fusarium* spp. por medio de microcultivos en cámara húmeda. En los seis aislados monospóricos fue posible observar estructuras típicas de *Fusarium* spp. como son macroconidios, fiálides, microconidios y clamidosporas (Leslie & Summerell, 2006). Es importante señalar que también se observaron diferencias en la morfología de los macroconidios, fiálides y la presencia o ausencia de clamidosporas entre los seis aislados (Figura 4).

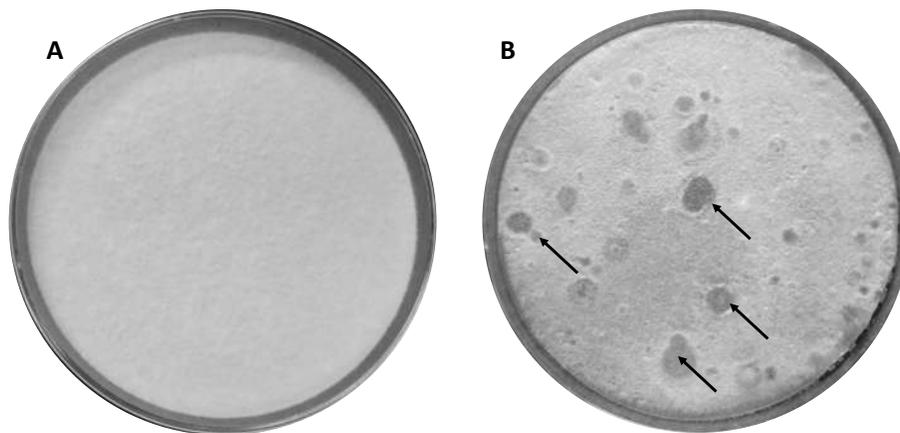


**Figura 4. Características morfológicas de las cepas de *Fusarium* spp. empleados en este estudio.** Morfología de macroconidios y disposición de las fiálides de los aislados *Fus* 1 (A y G), *Fus* 2 (B y H), *Fus* 3 (C y I), *Fus* 4 (D y J), *Fus* 5 (E y K) y *Fus* 6 (F y L). Clamidosporas formadas por *Fus* 3 (M), *Fus* 4 (N) y *Fus* 5 (O).

## Aislamiento y descripción morfológica de bacterias edáficas con potencial antagonista a *Fusarium* sp.

### Aislamiento de bacterias edáficas

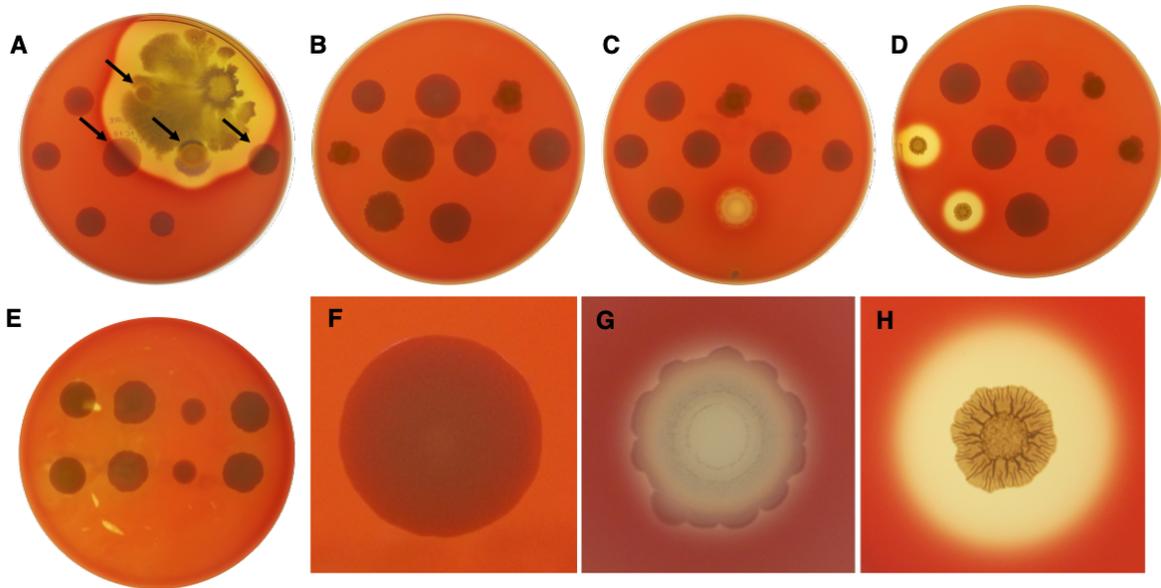
Los conidios de *Fusarium* sp. inoculados en el tratamiento testigo generaron un crecimiento micelial uniforme sobre la placa de Petri (Figura 5A). Mientras que en las placas co-inoculadas con *Fusarium* sp. y las suspensiones de suelo, se identificaron zonas de inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium* sp. formando halos alrededor de algunas colonias microbianas (Figura 5B). Se seleccionaron colonias bacterianas del centro de halos de inhibición de crecimiento y se transfirieron a medio LB sólido. De esta manera se obtuvieron 36 aislados bacterianos.



**Figura 5. Crecimiento micelial de conidios de *Fusarium* sp. en medio PDA.** (A) Micelio de *Fusarium* sp. sobre el medio de cultivo, (B) Crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en medio PDA co-inoculado con suspensión de suelo. Los cultivos se incubaron a 25 °C durante 7 días. Las flechas señalan halos de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp.

### Selección de aislados bacterianos no hemolíticos

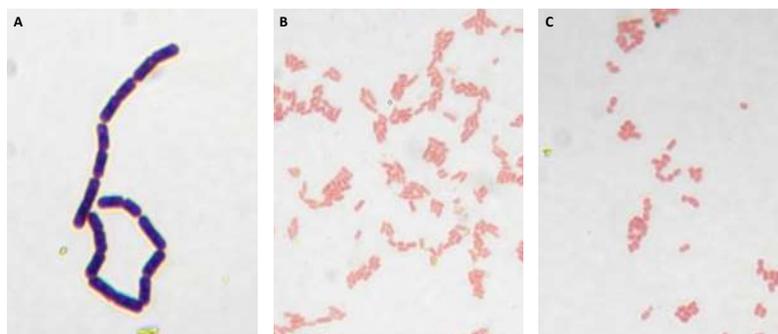
Para descartar que los 36 aislados bacterianos tuvieran actividad patogénica, fueron aislados en agar sangre. Ninguno de los aislados presentó hemólisis del tipo alfa ( $\alpha$ ), 32 presentaron hemólisis gamma ( $\gamma$ ), la cual se manifiesta por la ausencia de actividad de hemolisina y cuatro presentaron actividad hemolítica beta ( $\beta$ ), la cual se reveló por la presencia de halos translucidos alrededor de las colonias bacterianas y fueron eliminadas de la colección (Figura 6). Los 32 aislados no hemolíticos fueron criopreservados en glicerol y se mantienen en ultracongelación.



**Figura 6. Prueba de hemólisis de los aislados bacterianos en medio de cultivo agar-sangre.** (A-D) aislados bacterianos creciendo en agar-sangre. (E) Repetición de la prueba de hemólisis para los aislados indicados con flechas en A. (F) Aislado bacteriano con hemólisis g característica, (G y H) Manifestaciones de hemólisis b.

#### Caracterización de los aislados bacterianos seleccionados

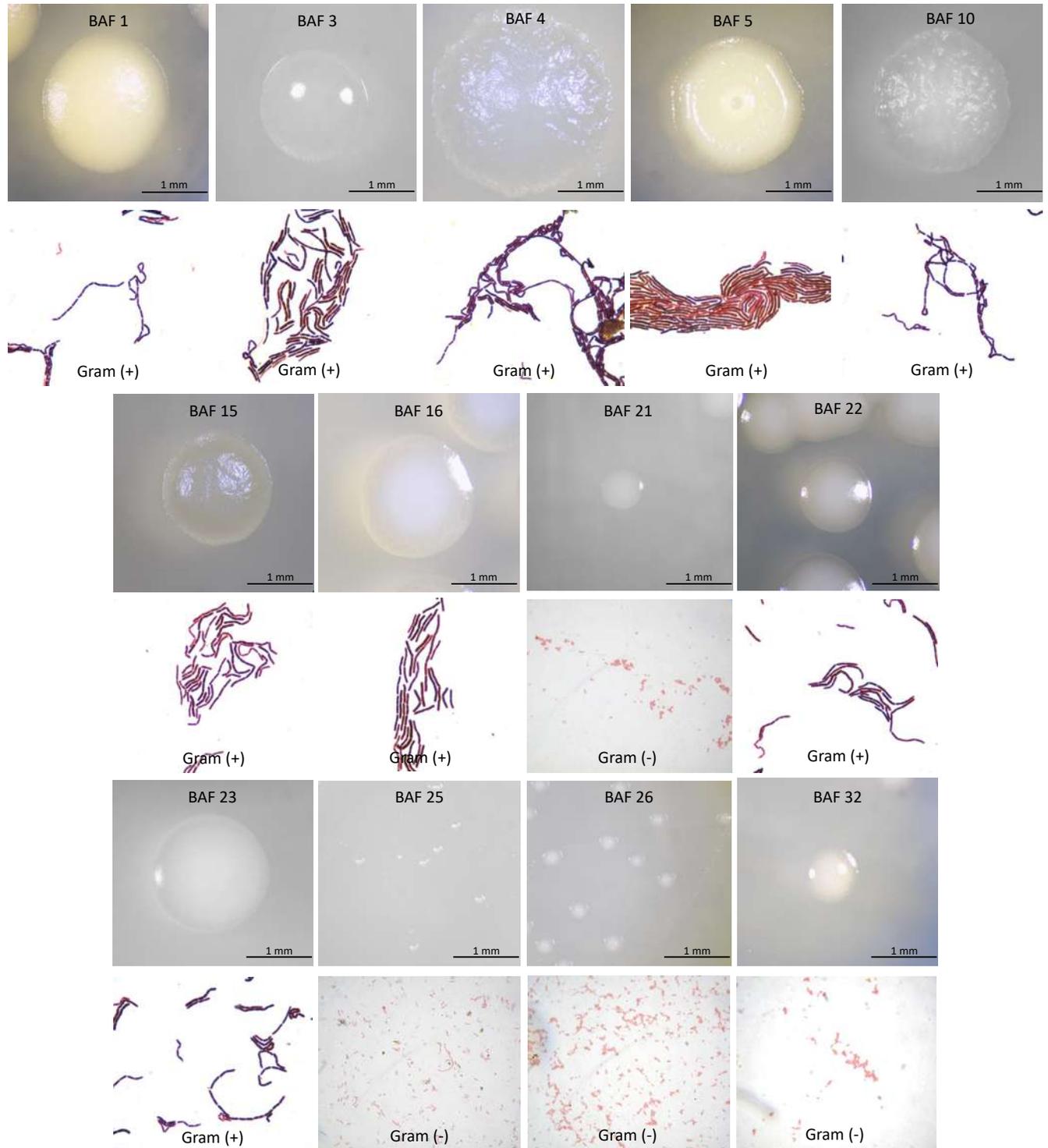
Los 32 aislados seleccionados fueron caracterizados por el tipo de respuesta a la tinción de Gram, así como a su organización celular y morfología colonial. De los 32 aislados, 23 fueron estreptobacilos Gram positivos, 9 fueron Gram negativos, uno de ellos presenta formas de diplococos y 8 de bacilos (Figura 7).



**Figura 7. Respuesta a la tinción de Gram y formas celulares presentadas por los aislados obtenidos.** A) estreptobacilos (Gram +), B) bacilos (Gram -), C) diplococos (Gram -).

La morfología colonial fue muy similar entre los Gram negativos y más diversa en las bacterias Gram positivas, destacando principalmente, formas circulares de 1 a

3 mm de diámetro, de forma umbonada, y textura rugosa. La Figura 8 muestra los diferentes tipos de morfología celular que presentaron los aislados, así como la respuesta a la tinción de Gram de cada uno.



**Figura 8. Aislados bacterianos representativos de las diferentes morfologías coloniales observadas.** Se observa en la parte superior de la imagen de la colonia la clave BAF de aislado y su respectivo número y en la imagen inferior se muestra la respuesta a tinción de Gram de cada uno de los aislados.

Con los datos de la caracterización colonial y celular se elaboró una matriz de descriptores de los 32 aislados, se ordenaron y se identificaron 13 grupos de similitud, además, de manera arbitraria, se seleccionó un aislado representativo de cada grupo, para los estudios posteriores (Cuadro 3).

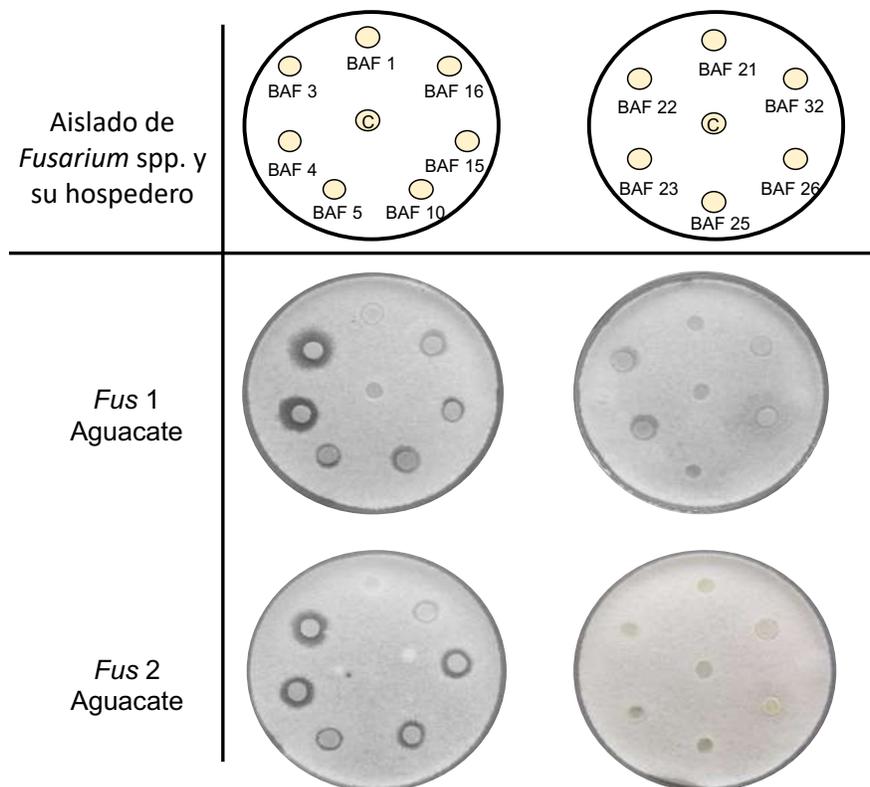
**Cuadro 3.** Características morfológicas de las colonias, tinción de Gram y organización celular de los 32 aislados seleccionados.

GRUPO	CLAVE	FORMA	TAMAÑO	ELEVACIÓN	TEXTURA	BORDE DEL MARGEN	CONSISTENCIA	COLOR	GRAM	ORGANIZACIÓN CELULAR
1	<b>BAF 26*</b>	Circular	<1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
	BAF 27	Circular	<1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
	BAF 28	Circular	<1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
	BAF 30	Circular	<1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
	BAF 31	Circular	<1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
2	<b>BAF 21*</b>	Circular	1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Diplococo
3	<b>BAF 1*</b>	Circular	2 mm	Elevada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 7	Circular	2 mm	Elevada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 9	Circular	2 mm	Elevada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
4	<b>BAF 3*</b>	Circular	2 mm	Convexa	Lisa	Entero	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
5	<b>BAF 23*</b>	Circular	2 mm	Convexa	Rugoso	Entero	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
6	<b>BAF 22*</b>	Circular	2 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
7	<b>BAF 10*</b>	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 11	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 12	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 13	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 17	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 18	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 19	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 20	Circular	2 mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
8	<b>BAF 5*</b>	Circular	2 mm	Crateriforme	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
9	<b>BAF 16*</b>	Circular	> 3mm	Convexa	Lisa	Entero	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 8	Circular	> 3mm	Convexa	Lisa	Entero	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 6	Circular	> 3mm	Convexa	Lisa	Entero	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
10	<b>BAF 15*</b>	Circular	> 3mm	Convexa	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 24	Circular	> 3mm	Convexa	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 2	Circular	> 3mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
11	<b>BAF 4*</b>	Circular	> 3mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
	BAF 14	Circular	> 3mm	Umbonada	Rugoso	Ondulado	Suave	Blanco	+	Estreptobacilo
12	<b>BAF 25*</b>	Irregular	< 1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
13	<b>BAF 32*</b>	Irregular	1 mm	Umbonada	Lisa	Entero	Suave	Amarillo	-	Bacilo
	BAF 29	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	-	Bacilo

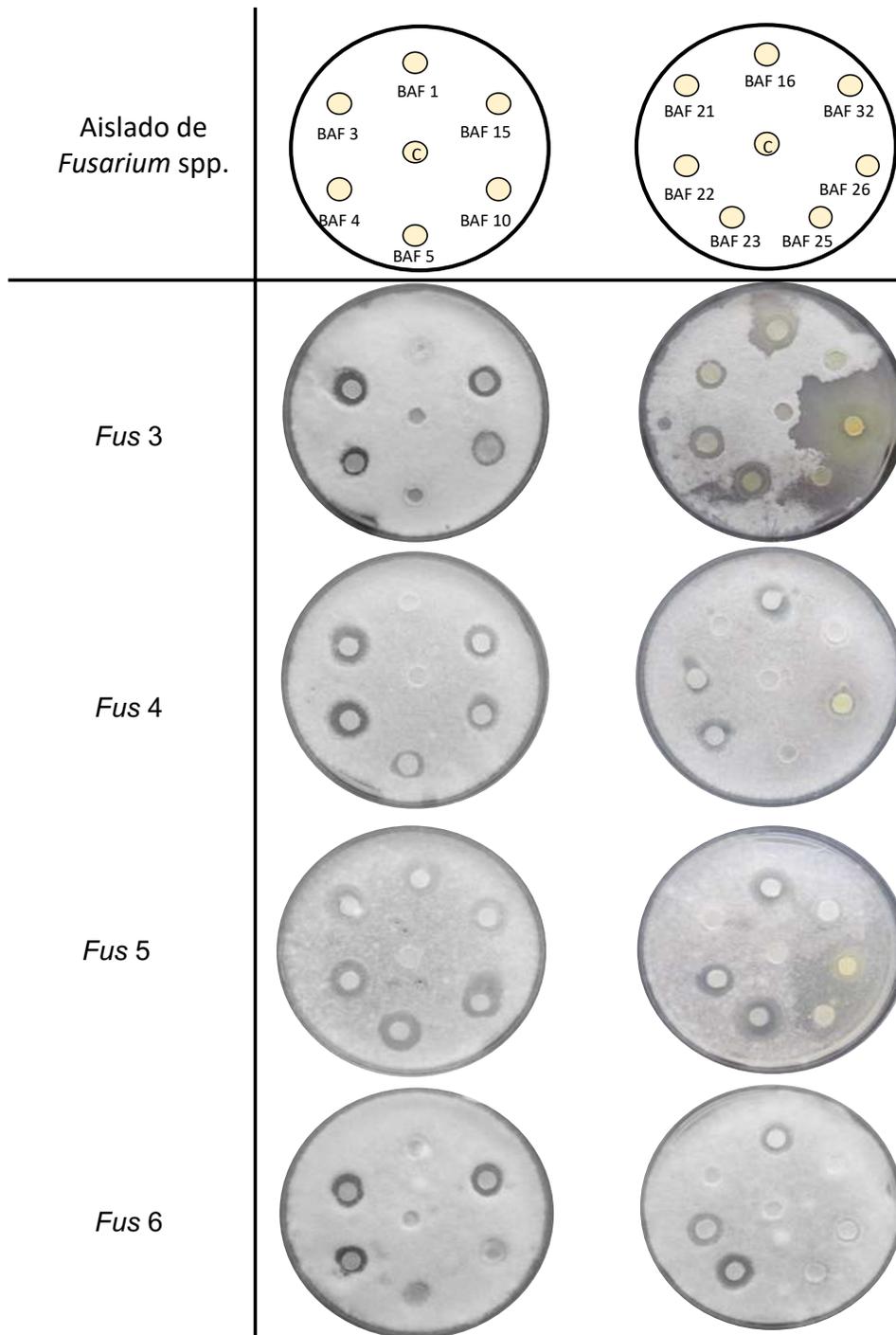
\* Aislado representativo de cada grupo. Seleccionado de manera arbitraria.

## Selección de aislados bacterianos con potencial antagónico a *Fusarium*

Para seleccionar los aislados bacterianos con mayor potencial de inhibición, se realizó un escrutinio preliminar de antagonismo de los 13 aislados bacterianos contra los seis aislados de *Fusarium* spp. (*Fus* 1 a *Fus* 6). Los 13 aislados bacterianos generaron halos de inhibición del crecimiento micelial alrededor de los discos fúngicos inoculados. El diámetro de inhibición varió dependiendo del aislado bacteriano, pero también del aislado del hongo utilizado en la confrontación. Mientras que algunas bacterias como BAF 3 y BAF 4 presentaron antagonismo a los seis aislados de *Fusarium* spp., BAF 1 no mostró una respuesta antagónica clara con ninguno. *Fus* 3 fue susceptible a la mayoría de las bacterias, mientras que las 13 bacterias presentaron un efecto de inhibición muy limitado contra *Fus* 5 (Figuras 9 y 10).



**Figura 9. Respuesta antagónica de bacterias aisladas de suelo co-inoculadas contra las cepas *Fusarium* 1 y *Fusarium* 2 *in vitro*.** El esquema de la parte superior de la imagen representa la disposición de los discos de papel filtro inoculados con cada uno de los trece aislados bacterianos seleccionados para evaluar su potencial antagónico contra *Fusarium* spp. En el esquema, la letra C indica el control al cual se le agregó medio de cultivo inocuo.



**Figura 10. Respuesta antagónica de bacterias aisladas de suelo contra las cepas *Fus 3* al *6 in vitro*.** El esquema de la parte superior de la imagen representa la disposición de los discos de papel filtro inoculados con cada uno de los trece aislados bacterianos seleccionados para evaluar su potencial antagónico contra *Fusarium* spp. En el esquema, la letra C indica el control al cual se le agregó medio de cultivo inocuo.

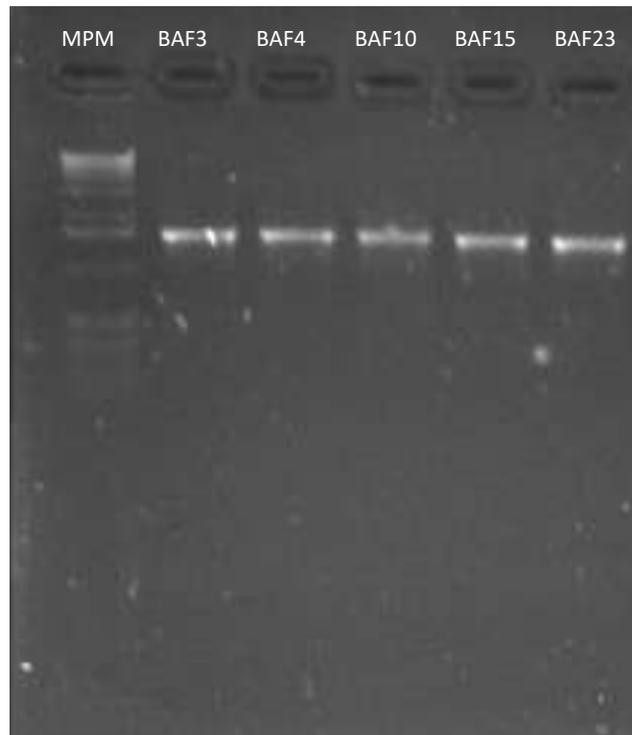
Los aislados bacterianos BAF 3, BAF 4, BAF 10, BAF 15 y BAF 23 fueron seleccionados como los de mayor potencial antagonista, los cuales mostraron halos de inhibición del crecimiento micelial de mayor diámetro, en el mayor número de aislados de *Fusarium* spp. utilizados (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Escrutinio preliminar de antagonismo.** Valor de grado de antagonismo, para el cual se estableció una escala arbitraria de acuerdo al diámetro del halo de inhibición en el crecimiento micelial: 0= ausencia de halo; 1= entre 0.1-0.3 cm; 2= entre 0.4-0.6 cm; 3= entre 0.7-1.0 cm.

BAF	<i>Fus</i> 1	<i>Fus</i> 2	<i>Fus</i> 3	<i>Fus</i> 4	<i>Fus</i> 5	<i>Fus</i> 6
BAF 1	1	0	0	0	3	0
BAF 3	2	2	2	3	3	2
BAF 4	2	2	2	3	3	2
BAF 5	1	1	1	2	2	2
BAF 10	1	1	2	3	3	1
BAF 15	1	2	2	2	3	2
BAF 16	1	1	2	2	2	2
BAF 21	0	0	1	1	0	0
BAF 22	1	1	2	2	2	1
BAF 23	1	1	2	2	3	3
BAF 25	0	0	0	1	1	1
BAF 26	1	1	1	1	1	1
BAF 32	1	1	1	1	1	1

## Caracterización molecular de bacterias edáficas con potencial antagónico

Para la caracterización molecular de las bacterias que mostraron actividad antagónica, se aisló DNA total y se amplificó el gen 16S con los iniciadores fD1 y rD1 (Figura 11).

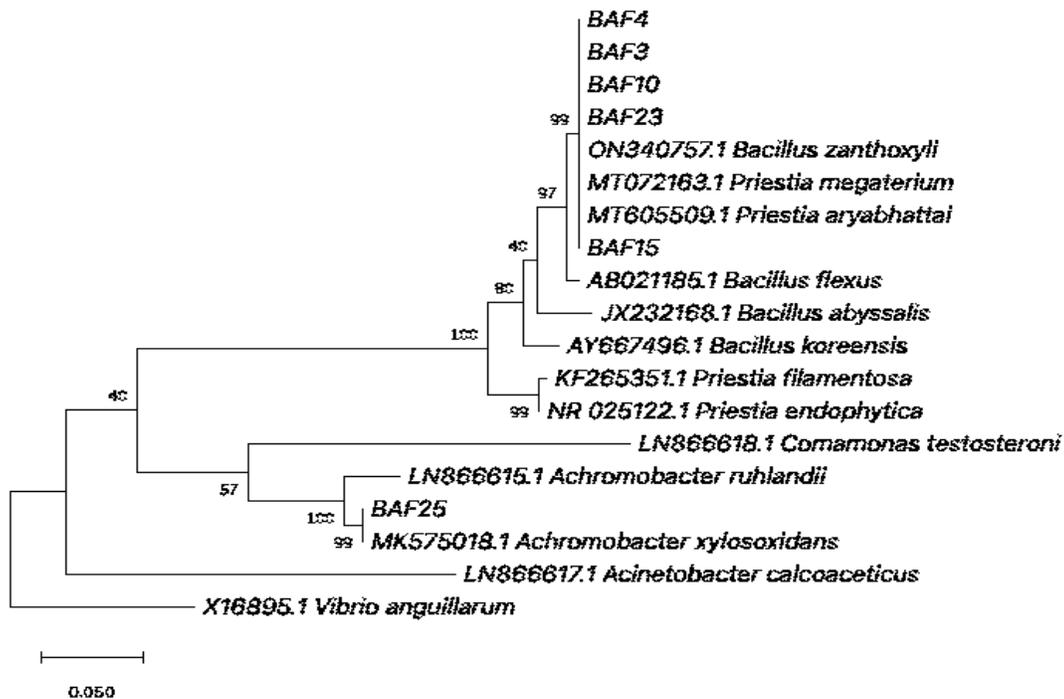


**Figura 11. Amplificación del gen 16S de las bacterias seleccionadas.** MPM, marcador de peso molecular de 1 kb; (+).

De acuerdo con los resultados de análisis tipo BLAST en la plataforma de la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information), las secuencias nucleotídicas obtenidas de los amplicones de los cinco aislados seleccionados: BAF 3, BAF 4, BAF 10, BAF 15 y BAF 23, presentan una similitud del 100% con *Priestia megaterium*.

Se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias obtenidas con en el programa MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11 (Tamura, Stecher, and Kumar 2021), por el método de máxima verosimilitud y el modelo de Jukes-Cantor (1969). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron

automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas mediante el modelo Jukes-Cantor y luego seleccionando la topología con un valor logarítmico de verosimilitud superior (-6790,41) (Figura 12). El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 19 secuencias nucleotídicas, incluyendo las de los cinco aislados, especies alineadas con alta similitud del orden Bacillales, así como de grupos bacterianos del orden Burkholderiales, Pseudomonadales y como grupo externo *Vibrio anguillarum*. Hubo un total de 1416 posiciones en el conjunto de datos final.

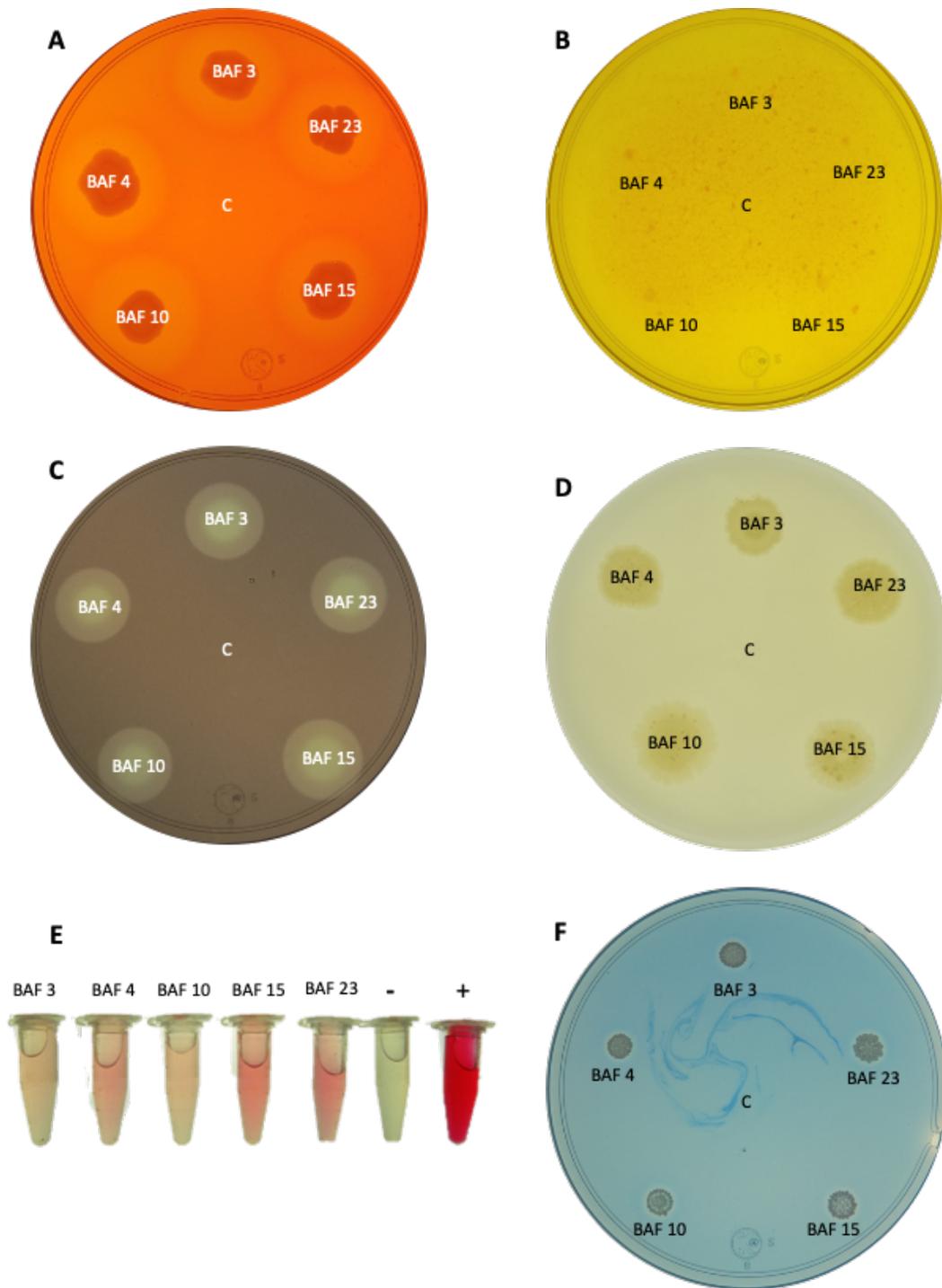


**Figura 12.** Árbol filogenético de los cinco aislados bacterianos con potencial antagónico a *Fusarium* spp. seleccionadas. Con base en la secuenciación de nucleótidos de gen 16S ARNr. Se utilizó el método Neighbor-Join y BioNJ con 1000 réplicas de Bootstrap. (Tamura K y Stecher, 2020).

### Identificación de mecanismos antifúngicos y de promoción del crecimiento vegetal por los aislados bacterianos

La actividad de proteólisis de caseína se observó en los cinco aislados seleccionados por su alta actividad antagonista a *Fusarium* spp. BAF 3, BAF 4, BAF

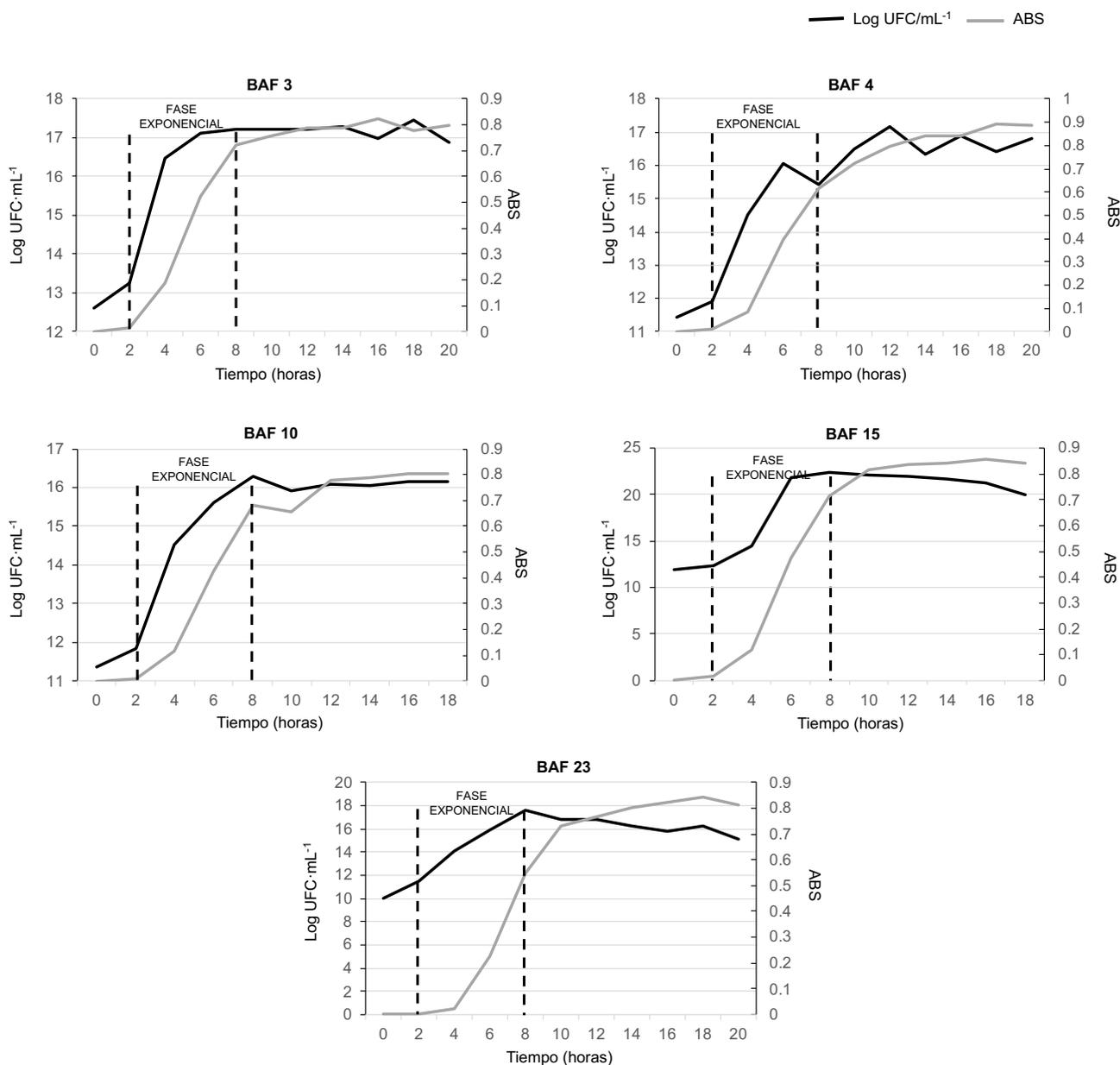
10, BAF 15 y BAF 23, mostrando halos de disminución en el color rojo en el medio de Agar leche desnatada, revelado con Rojo Congo (Figura 13 A). Los cinco aislados presentaron actividad celulolítica en el medio CMC, revelada con solución de yodo (Figura 13 C). La producción de sideróforos también se detectó en los cinco aislados (Figura 13 F). Asimismo, se observó que todos fueron capaces de sintetizar AIA. Por el contrario, la actividad quitinolítica no se observó en ninguno de los aislados incubados durante 72 h en el medio de detección de quitinasa (Figura 13 B), así como tampoco fueron capaces de solubilizar fosfato de calcio en el medio PVK (Figura 13 D).



**Figura 13. Pruebas bioquímicas realizadas para la detección de posibles mecanismos de promoción.** A) Producción de proteasa revelada por halos transparentes alrededor de las colonias; B) Actividad quitinolítica, la cual se denota por el cambio de coloración en el medio de amarillo a azul (en este caso fue negativa); C) Degradación de celulosa, revelada por la formación de un halo alrededor de las colonias; D) Solubilización de fosfatos, en este caso negativa; E) Producción de AIA revelado por la coloración rosa en el medio; F) Producción de sideróforos, revelados por un cambio en la coloración de las colonias.

## Patrón de crecimiento de los aislados bacterianos

Para caracterizar el crecimiento de los aislados bacterianos seleccionados y calcular el punto máximo de crecimiento exponencial, se generaron curvas de crecimiento *in vitro* de cada aislado, con los datos de densidad óptica por absorbancia a 540 nm y el Log de UFC·mL<sup>-1</sup> (Figura 14).



**FIGURA 14. Curvas de crecimiento de las cinco bacterias seleccionadas.** Las líneas punteadas marcan el inicio y el fin de la fase exponencial tanto para la variable de Log de UFC·mL<sup>-1</sup> como de absorbancia a 540 nm.

Posteriormente se calculó la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de generación (g) de ambas variables (Log de UFC·mL<sup>-1</sup> y ABS). Las tasas de crecimiento microbiano bajo el parámetro de Log de UFC·mL<sup>-1</sup> fluctuaron entre 0.9-1.6 generaciones cada 25-45 min; mientras que bajo el parámetro de absorbancia a 540 nm la tasa de generación fluctuó de 1.03–1.17 generaciones cada 35–40 min. El tiempo en que ambas curvas se encontraron en su punto máximo de crecimiento fluctuó entre 4-6 h y absorbancias de 0.08-0.22, como se observa en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) y de tiempo de generación (g), con los que se obtuvo el punto máximo de crecimiento exponencial de los aislados seleccionados con potencial antagónico.

Bacteria	Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ )		Tiempo de generación (g)		Punto máximo de crecimiento exponencial		
	ABS	Log de UFC·mL <sup>-1</sup>	ABS	Log de UFC·mL <sup>-1</sup>	Tiempo (h)	ABS	Log de UFC·mL <sup>-1</sup>
BAF 3	1.2	1.6	32.82	25.9	4	0.189	1.43x10 <sup>7</sup>
BAF 4	1.05	1.29	39.53	32.11	4	0.082	2.0x10 <sup>6</sup>
BAF 10	1.17	1.33	35.3	31.06	4	0.116	2.0x10 <sup>6</sup>
BAF 15	1.03	1.09	40	38.04	4	0.12	2.03x10 <sup>6</sup>
BAF 23	1.16	0.9	35.57	45.91	6	0.228	7.65x10 <sup>6</sup>

Además, se calculó la correlación (r) entre ambas variables y se observó correlación positiva entre el Log de UFC·mL<sup>-1</sup> y la ABS; por lo que se justifica el uso de la ecuación de la curva de absorbancias (ABS) en la fase exponencial para predecir el crecimiento poblacional de los aislados bacterianos (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Correlación de Pearson entre las variables ABS y Log UFC·mL<sup>-1</sup> (r) y ecuación de la recta de absorbancias en la fase exponencial, con su respectivo coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>); datos con los que se realizó la predicción de crecimiento de los aislados bacterianos.

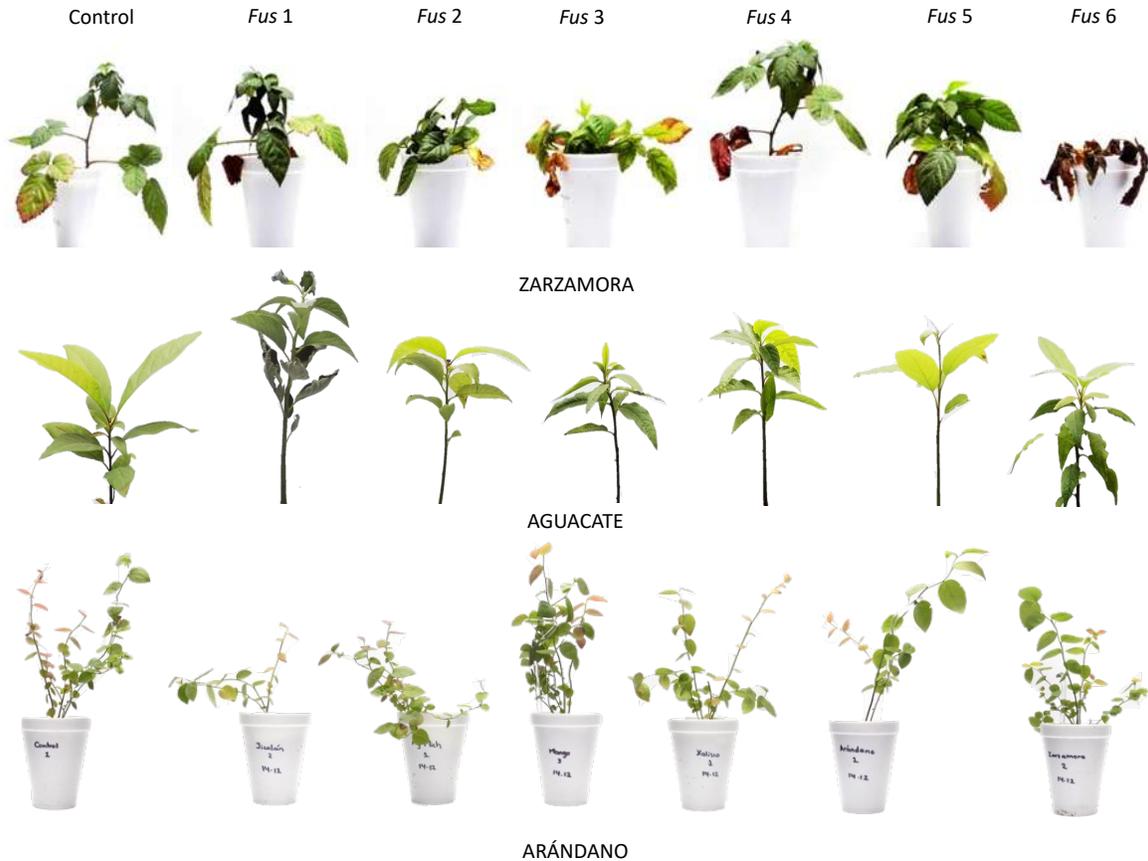
Bacteria	<i>r</i>	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>
BAF 3	0.8786	Y=0.2447x-0.25	0.9847
BAF 4	0.8998	Y=0.2145x-0.0825	0.9562
BAF 10	0.9084	Y=0.2317x-0.271	0.9677
BAF 15	0.9263	Y=0.0.245x-0.2825	0.964
BAF 23	0.7587	Y=0.245x-0.2305	0.9902

### **Selección de material biológico evaluar el efecto de la confrontación antagónica en planta**

Para evaluar el efecto de las bacterias antagónicas en un bioensayo en planta, se realizó un escrutinio para seleccionar una planta modelo que mostrara susceptibilidad a uno de los seis aislados de *Fusarium* sp. Para lo cual se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad en zarzamora (*Rubus* sp.), arándano (*Vaccinium* sp.), aguacate (*Persea americana*) y tomate (*Solanum lycopersicum*).

#### **Pruebas de patogenicidad en plantas de zarzamora, arándano y aguacate**

Las plantas inoculadas con los seis aislados de *Fusarium* spp. se mantuvieron durante 90 días, sin embargo, las plantas de arándano y aguacate no mostraron síntomas evidentes de enfermedad, mientras que las plantas de zarzamora sí presentaron distintos niveles de daño (Figura 15).



**Figura 15. Pruebas de patogenicidad de aislados de *Fusarium* spp. en planta.** Daños presentados en *Rubus* sp., *Persea americana* y *Vaccinium* sp., 90 días después de inoculadas con los aislados *Fus* 1, *Fus* 2, *Fus* 3, *Fus* 4, *Fus* 5 y *Fus* 6 y mantenidas en vivero.

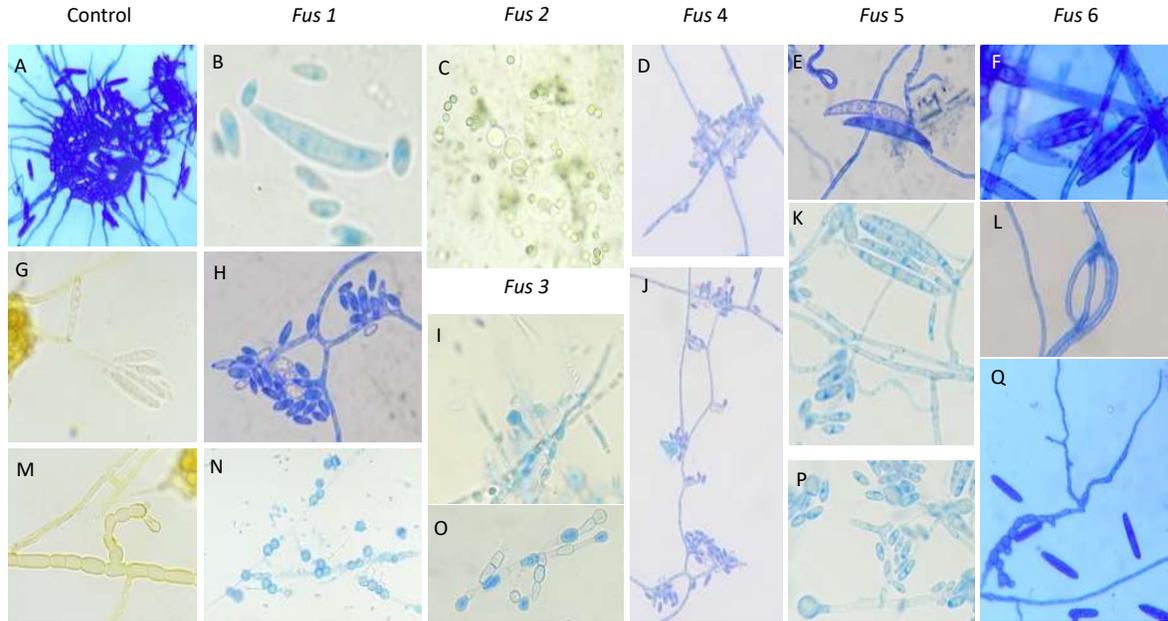
El nivel de daño en las plantas de zarzamora se estimó como porcentaje de severidad de daño al final del experimento y el Índice de Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) se calculó con los registros de daño a los 10, 30 y 90 días. El mayor porcentaje de severidad de daños con ambos parámetros se observó en las plantas inoculadas con *Fus* 6, con un valor de 86.6 % de severidad y un ABCPE de 8.8; seguido de *Fus* 4, *Fus* 1 y *Fus* 3 (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Resultados de la prueba de patogenicidad de las plantas de *Rubus* sp. expresados en porcentaje de severidad de la enfermedad (% severidad) y en índice de Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE).

Aislado	% severidad	ABCPE
Control	46.6	4.8
<b>Fus 1</b>	<b>60</b>	<b>7.5</b>
<i>Fus 2</i>	46.6	5.1
<b>Fus 3</b>	<b>53.3</b>	<b>8.1</b>
<b>Fus 4</b>	<b>66.6</b>	<b>7.1</b>
<i>Fus 5</i>	33.3	3.8
<b>Fus 6</b>	<b>86.6</b>	<b>8.8</b>

Microorganismos asociados a las raíces de las plantas de *Rubus* sp.

Además de los daños de marchitamiento en los tratamientos de zarzamora con los distintos aislados de *Fusarium* spp., se observó que las plantas control, que no fueron inoculadas, también presentaron algunos síntomas de marchitamiento (Figura 15 y Cuadro 7), por lo que se realizó el aislamiento de microorganismos presentes en las raíces de las plantas. Todos los tratamientos inoculados con los distintos aislados *Fus* presentaron microorganismos con estructuras morfológicas propias de *Fusarium* spp. (Figura 16), mientras que en el tratamiento control se encontró un organismo con estructuras características de ***Cylindrocarpon destructans*** (Mora-Sala et al., 2018). De igual forma, se aislaron estructuras que no corresponden a las presentadas por *Fusarium* sp. en el tratamiento inoculado con el aislado *Fus 2* (Figura 16 C). Estos resultados sugieren que las plantas utilizadas para el experimento originalmente o durante la incubación en vivero pudieron haberse contaminado con otros organismos.



**Figura 16. Estructuras presentadas en el aislamiento del hongo en las pruebas de patogenicidad en zarzamora. Estructuras características de *Cilyndrocarpon destructans* (Mora-Sala et al. 2018) teñidas con azul de metileno y lactofenol blanco. Conidióforo esporoquial (A); macroconidios formados en fiálides (G); clamidosporas en micelio (M). Estructuras características de *Fusarium* spp. (Leslie, 2006) teñidas con azul de lactofenol. Diferentes formas de macroconidios (B, D, E, F, K); microconidios de *Fusarium* sp. formados en fiálides (H, J, K); hifa(L); clamidosporas en micelio (N, I, O, P, Q). Estructuras de microconidios y clamidosporas sin identificar (C). En la parte superior de cada columna se indica el tratamiento del cual fueron aislados los organismos**

### Prueba de patogenicidad en tomate

La prueba de patogenicidad en tomate se llevó a cabo *in vitro*, con semilla certificada de la variedad Río Grande. En estas condiciones también se observó que el aislado *Fus 6* fue el que provocó mayores síntomas de la enfermedad (Figura 17) y se reflejó en un mayor porcentaje de severidad de la enfermedad (Cuadro 8).



**Figura 17. Daños presentados en plantas de tomate después de la prueba de patogenicidad con los aislados de *Fusarium* spp. *in vitro* después de 8 días.** Raíz sana de las plantas control (A), raíces que presentan daños como pardeamiento, ahogamiento de tallo y desprendimiento (B-E), plantas control (F), plantas con daños en raíz y ahogamiento de tallo (G-J).

Cuadro 8. Resultados de la prueba de patogenicidad en tomate. Los daños se expresaron en porcentaje de severidad de la enfermedad, con base en la escala de daños generada a partir de lo reportado por (Khalil et al., 2021).

Aislado	% severidad
Control	0
<i>Fus 1</i>	52
<i>Fus 3</i>	15.3
<i>Fus 4</i>	61.3
<i>Fus 6</i>	74.3

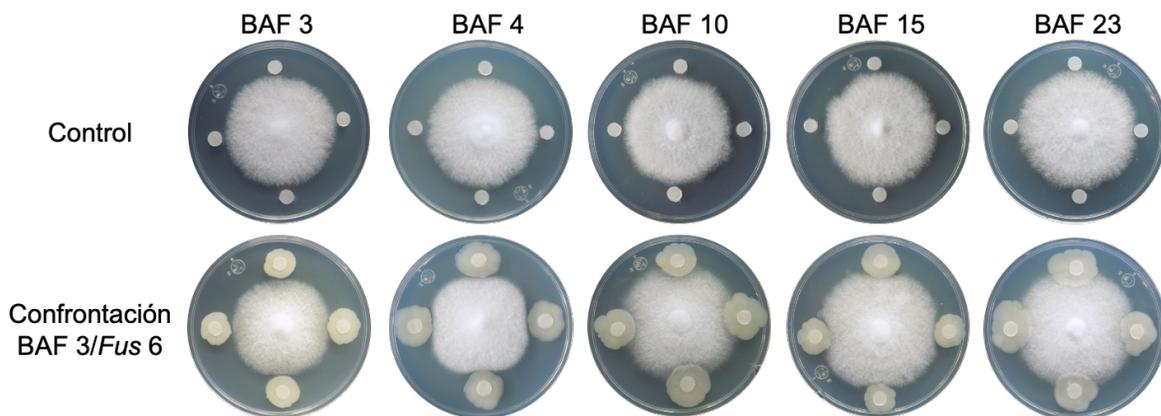
Con base en los resultados de las pruebas de patogenicidad se seleccionó al tomate como planta modelo para establecer el bioensayo, con el fin de garantizar la ausencia de contaminación de otros patógenos debido al origen de las plantas. Por otro lado, se eligió el aislado *Fus 6*, debido a que en las pruebas de patogenicidad con zarzamora y tomate fue el que presentó mayor porcentaje de severidad con 86.3 y 74.3 %, respectivamente.

### Prueba de antagonismo dual

Confrontación dual con las bacterias seleccionadas

La selección del aislado bacteriano a utilizar en el bioensayo se determinó a partir de resultado de las confrontaciones duales, en donde se confrontaron los aislados bacterianos BAF 3, BAF 4, BAF 10, BAF 15 y BAF 23 con el aislado fúngico *Fus 6*.

Para determinar el nivel de antagonismo de las bacterias se comparó el área de crecimiento micelial del hongo en presencia de cada aislado con el área micelial del hongo en el tratamiento control (en ausencia de bacterias) (Figura 18).



**Figura 18. Ejemplo representativo de los tratamientos en la confrontación dual.** En la parte superior se muestran controles axénicos realizados con el aislado *Fus 6* y en la inferior las confrontaciones con el aislado *Fus 6* y cada uno de los aislados bacterianos BAF 3, BAF 4, BAF 10, BAF 15 y BAF 23.

El resultado se expresó en porcentaje de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria, respecto al control. Se observaron distintos porcentajes de inhibición de crecimiento micelial del hongo, siendo en la confrontación con BAF 3 en la que *Fus* 6 tuvo el mayor porcentaje de inhibición (Figura 19). Con base en este resultado, se seleccionó a BAF 3 para evaluar su efecto en el desarrollo de tomate frente a la presencia de *Fus* 6.

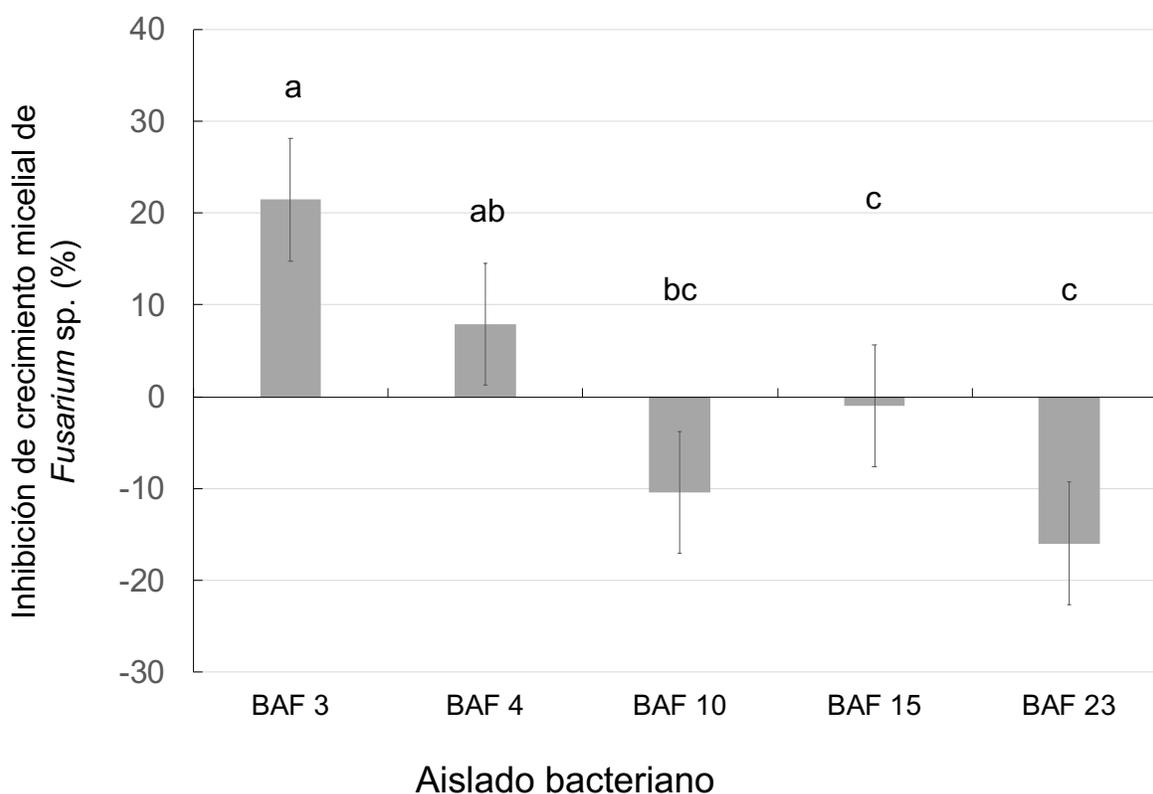


Figura 19. **Confrontación dual de aislados bacterianos con *Fus* 6.** La gráfica representa el área de crecimiento del hongo en las confrontaciones expresada en porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Fus* 6 en la confrontación dual. Las letras indican diferencia estadística significativa aplicando la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ;  $n=3$ ). Error estándar indicado por las líneas en las barras.

### Bioensayo en plantas de tomate

Las plantas de tomate mantenidas en vivero bajo los distintos tratamientos de inoculación con *Fus* 6 y BAF 3 no manifestaban síntomas de la enfermedad, incluso 90 días después de haber sido inoculadas (Figura 20); por ello, se colectaron raíces

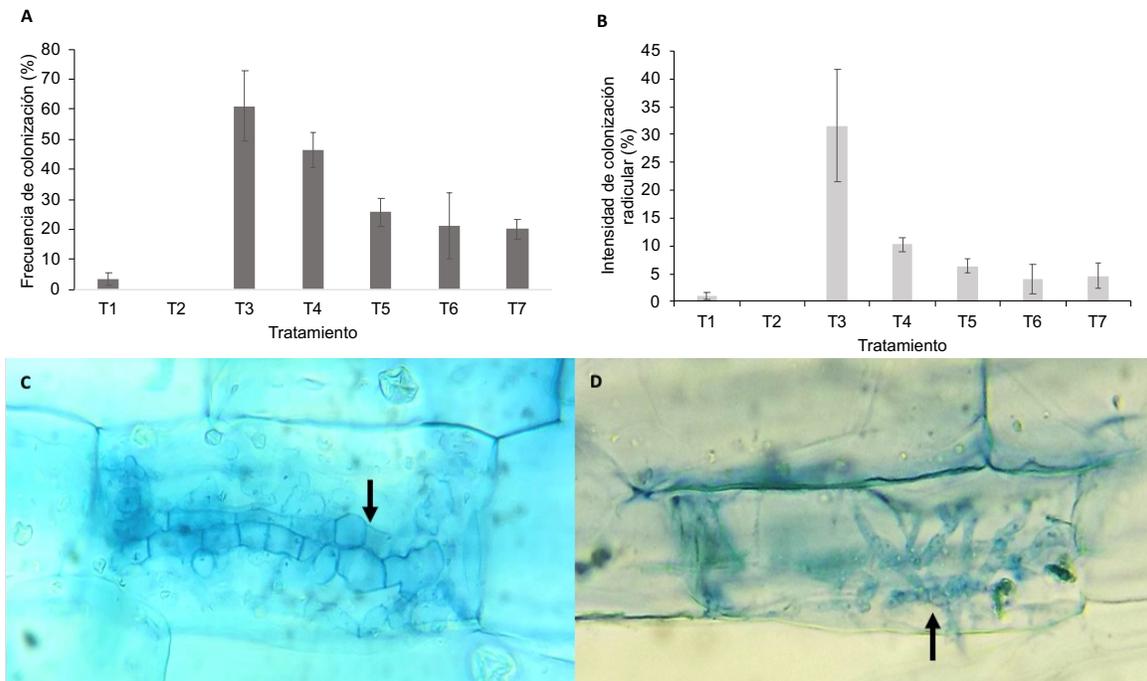
de las plantas para evaluar la presencia de *Fusarium* y estimar la frecuencia de infección en los distintos tratamientos.



**Figura 20. Evaluación de síntomas en plantas de tomate en el bioensayo con BAF 3 y *Fus 6*, 90 días después de la inoculación.** Los tratamientos fueron: T1, control (A); T2, inoculado con BAF 3 (B); T3, inoculado con *Fus 6* (C); T4, inoculado simultáneamente con BAF 3 y *Fus 6* (D); T5, Inoculado con BAF 3 y *Fus 6* (reinoculado con BAF 3 ocho días después) (E); T6, Inoculado con BAF 3 y tres días después con *Fus 6* (F); T7, Inoculado con BAF 3 y ocho días después con *Fus 6* (G).

Las estructuras fúngicas intrarradicales se revelaron utilizando la técnica de tinción con azul de tripano, lo cual permitió observar la presencia de hifas dentro de células corticales (Figura 21 C y D). Se adaptó el método para cuantificar la colonización micorrízica reportado por Trouvelot et al. (1896) para calcular la frecuencia de infección radical y la intensidad de infección por *Fusarium* sp. Se observó mayor frecuencia de infección en el tratamiento T3 (inoculado únicamente con *Fus 6*), en

el que se reconocieron signos de infección en el 60 % de los fragmentos (Figura 20 A). La intensidad de infección más alta fue del 30 % presentada en las raíces del tratamiento T3 (Figura 20 B). Es decir, el 60 % de los fragmentos de raíz del tratamiento T3 mostraron infección y el grado de infección se encontró entre la categoría 2 y 3 en la escala de intensidad de colonización de Trouvelot (Figura 3).



**Figura 21. Estimación de la infección de *Fus 6* en células corticales de la raíz de tomate.** Porcentajes de frecuencia de infección en los fragmentos observados (A); Porcentajes de intensidad de infección radicular (B); Hifas infectando células corticales observadas en tinción con azul de tripano (Phillips & Hayman, 1970) (C, D). En las gráficas los tratamientos corresponden a: T1, control; T2, inoculado con BAF 3; T3, inoculado con *Fus 6*; T4, inoculado simultáneamente con BAF 3 y *Fus 6*; T5, Inoculado con BAF 3 y *Fus 6* (reinoculado con BAF 3 ocho días después); T6, Inoculado con BAF 3 y tres días después con *Fus 6*; T7, Inoculado con BAF 3 y ocho días después con *Fus 6*. Las letras indican diferencia estadística significativa aplicando la prueba de comparación de medias Tukey ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ ). Error estándar indicado por las líneas en las barras.

Además, el tratamiento T2 (inoculado con BAF 3) presentó 0% de frecuencia de infección, indicando que ninguno de los fragmentos de raíz examinados presentó estructuras de *Fusarium* sp. Por otro lado, el tratamiento T1 (control) mostró una frecuencia de infección menor al 10% y estadísticamente similar a T2 ( $p > 0.05$ ) (Figura 20 A). La intensidad de infección (Figura 20 B) en el tratamiento T2 corresponde a 0%, mientras que en T1 la intensidad es menor al 5%.

## DISCUSION

**El cultivo *in vitro* de bacterias edáficas en presencia de *Fusarium* sp. permite obtener bacterias capaces de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno.**

En el presente trabajo se exploró la posibilidad de obtener una PGPB con potencial para uso en el biocontrol del fitopatógeno *Fusarium* sp. Se llevó a cabo el crecimiento *in vitro* de una población de bacterias edáficas, a partir de muestras de suelo en medio PDA inoculado con *Fusarium* sp. como presión selectiva. Las bacterias capaces de inhibir el crecimiento fúngico fueron aisladas y seleccionadas por el mayor potencial antagónico en cultivos de confrontación dual con el patógeno *in vitro*. Posteriormente, se confirmó la capacidad de inhibición de un aislado bacteriano en la frecuencia e intensidad de infección causadas por *Fusarium* sp. en raíces de plantas de tomate. Con la estrategia de aislamiento utilizada en el presente trabajo es posible aplicar la presión selectiva *in vitro* desde el aislamiento, lo cual permite obtener aislados con las características deseables y disminuir la inversión en tiempo y recursos; ya que en algunos casos el escrutinio de agentes de biocontrol en las primeras etapas se realiza partiendo de colecciones de microorganismos muy numerosas. Por ejemplo, Jochum et al. (2019) en su trabajo de bioprospección de rizobacterias capaces de mitigar efectos de estrés por sequía, reportaron que a partir de un total de 200 microorganismos sometidos a las pruebas de selección, obtuvieron dos aislados capaces de mitigar los síntomas de estrés por sequía en plantas de trigo de manera significativa. Por su parte, Khalil et al. (2021) examinaron 1,875 cepas bacterianas con el objetivo de obtener algunas capaces de inhibir la incidencia de *F. oxysporum* en plantas de tomate. Por medio de este método tradicional, los autores obtuvieron solo cinco cepas candidatas para el control del patógeno en bioensayos con planta. Posteriormente y una vez aislados, éstos se someten a una presión de selección para la obtención de microorganismos capaces de promover crecimiento de las plantas y/o antagonizar contra patógenos, como lo describen Cordero-Ramírez et al. (2013); Khalil et al. (2021) y Kumar et al. (2017).

## **Identificación de las bacterias antagónicas aisladas y caracterización de propiedades metabólicas como posibles mecanismos de acción antimicrobiana y de promoción del crecimiento vegetal.**

La caracterización molecular mostró que los cinco aislados bacterianos seleccionados por su capacidad antagónica a *Fusarium* sp. presentan una secuencia nucleotídica del gen 16S del rDNA idéntica a las reportadas para *P. megaterium* en el banco de datos GenBank (NCBI) (Figura 12).

Gupta et al. (2020) utilizaron más de 300 genomas de *Bacillus* con los que analizaron las relaciones evolutivas a través de filogenómica, generaron árboles filogenéticos en los que se forman consistentemente 17 nuevos clados monofiléticos adicionales a *Subtilis* y *Cereus*. Propusieron que estos clados deberían ser reconocidos como nuevos géneros, y denominaron *Priestia* gen. Nov. para el clado *Megaterium* que contiene las especies anteriormente reconocidas como *B. megaterium*, *B. abyssalis*, *B. aryabhatai*, *B. endophyticus*, *B. filamentosus*, *B. flexus* y *B. koreensis* debido a dos inserciones o deleciones de firma conservada (CSIs) en la oligoribonucleasa NrnB que son compartidos por todos los miembros del clado. Cinco especies más cuyo genoma no ha sido analizado exhaustivamente (*B. paraflexus*, *B. qingshengii*, *B. taiwanensis*, *B. pseudoflexus* y *B. zanthoxyli*) también se indican como parte del clado. Además el nombre taxonómico de *B. zanthoxyli*; si bien ha sido efectivamente publicado, no ha sido válidamente publicado bajo las reglas de Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias.

Sería interesante mencionar que para tener una identificación de los cinco aislados de la misma cepa que permita delimitar diferencias a nivel de especies se requiere análisis más detallados; por ejemplo el mencionado por Gupta et al. (2020), mediante la amplificación y secuenciación de otros marcadores moleculares que permita ubicarlas como parte de alguna de las especies del clado mencionado.

Respecto a la descripción morfológica, Guzmán-Moreno et al. (2022) reportan que *P. megaterium* es un bacilo Gram positivo, forma colonias redondas, con bordes regulares, blancas de textura suave y de forma convexa, de 4-6 mm de diámetro

esta descripción morfológica coincide con las características morfológicas de los aislados obtenidos en este trabajo.

La presencia de quitina se puede observar en exoesqueleto de insectos y otros invertebrados como crustáceos, levaduras y es característica de pared celular de hongos. La presencia de quitina en pared celular de hongos es de interés ya que se han detectado enzimas que degradan la quitina en diferentes tipos de organismos como, hongos, arqueas, algas y bacterias (Beier & Bertilsson, 2013). Muchos de estos organismos productores de la enzima quitinasa, inhiben el crecimiento de hongos patógenos de plantas, degradando las paredes celulares que contienen (Agrawal & Kotasthane, 2012; Azizoglu et al., 2021; Kielak et al., 2013). Malik et al. (2022) y Swiontek Brzezinska et al. (2020) reportaron el aislamiento de bacterias con actividad quitinolítica a partir de suelo rizosférico, estas bacterias fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium* sp., tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

En nuestro trabajo las pruebas para identificar actividad de producción de quitinasas mostraron resultados negativos en los cinco aislados, lo que sugiere que la acción antifúngica a *Fusarium* sp. no depende de la producción de quitinasas. Sin embargo, algunos estudios señalan a *P. megaterium* y cepas bacterianas relacionadas, como agentes de control biológico contra *Fusarium graminearum* (Pan et al., 2015) y *Fusarium oxysporum* (Khanna et al., 2022 y Toloza-Moreno et al., 2020).

Pan et al. (2015) observaron que cepas de *P. megaterium* disminuyeron de manera significativa el crecimiento fúngico y la germinación de esporas *in vitro* y en condiciones de campo del patógeno *F. graminearum*, sin embargo, los mecanismos que confieren la acción inhibitoria no fueron determinados en su estudio.

Khanna et al. (2022) realizaron aislamiento de endófitos de garbazo, entre ellos, *P. megaterium*, (que exhibió producción de HCN y fue capaz de usar ACC como fuente de carbono). Posteriormente en un bioensayo, inocularon las cepas aisladas y observaron que su presencia, entre ellas, *P. megaterium* promovió la producción de compuestos fenólicos en la planta. Evaluaron la concentración de

compuestos fenólicos y el porcentaje de incidencia de la enfermedad y observaron que la producción de fenólicos fue inversamente proporcional a la incidencia de la enfermedad producida por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. A este respecto Compant et al. (2005) mencionan el cianuro de hidrógeno producido por *Pseudomonas* como un mecanismo de antibiosis.

Liu et al. (2023) observaron distintos patrones de producción de metabolitos secundarios en cepas de *P. megaterium* con actividad antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, de manera particular, las cepas con efecto inhibitorio de *S. aureus* tenía mayor contenido de L-fenilalanina y derivados como la tirosina y capsaicina, los cuales fueron asociados con su actividad inhibitoria ante *S. aureus*, pero no tuvieron efecto en el crecimiento de *E. coli*.

Los cinco aislados obtenidos en nuestro trabajo fueron positivos a la prueba de Ocas, lo cual indica que estos organismos producen sideróforos; Muchas bacterias suprimen el crecimiento de microorganismos nocivos mediante la producción de sideróforos, antibióticos y cianuro. Siendo los sideróforos, inhibidores de crecimiento de varios fitopatógenos, como *Phytophthora parasitica*, *Phythium ultimum*, *Fusarium oxysporum veridianthi* y *Sclerotinia sclerotium* (Ali & Vidhale, 2013).

Los sideróforos producidos por bacterias, pueden quelar hierro formando complejos de sideróforo-Fe<sup>+3</sup>, lo que provoca que el hierro no esté disponible para otros microorganismos que carezcan del sistema de detección y asimilación específico de estos complejos, limitando así el crecimiento de microorganismos patógenos (y otros); sin embargo, la mayoría de las plantas pueden crecer bajo concentraciones de Fe<sup>+3</sup> mucho menores que los microorganismos y muchas de ellas pueden reconocer y utilizar los complejos sideróforo-Fe<sup>+3</sup> bacterianos Kumar y Menon (2017). Además, los sideróforos pueden actuar como activadores de sistemas de resistencia sistémica inducida (Aznar & Dellagi, 2015; Shanmugam & Kanoujia, 2011). Por lo que la producción de sideróforos por parte de una bacteria puede promover el crecimiento de plantas y generar tolerancia a fitopatógenos.

Por su parte, Bach et al. (2022), sugieren que la actividad antifúngica de cepas de *P. megaterium* podría ser el resultado de la acción sinérgica de la producción de metabolitos secundarios, sideróforos y quitinasas.

Finalmente, se han reconocido cepas de *P. megaterium* capaces de solubilizar fosfatos (Elkoca et al., 2008; Lin et al., 2023), producción de AIA (Srinivasan et al., 1996), producción de proteasas (Kandaiah & Ramasamy, 2015), actividad celulolítica (Alshelmani et al., 2013) y la actividad de ACC desaminasa (Tolozano-Moreno et al., 2020). Además de la actividad antifúngica, las bacterias aisladas en este estudio fueron positivas a la producción de AIA, proteasas y actividad celulolítica.

### **La cepa de *P. megaterium* BAF3 inhiben la colonización de un aislado de *Fusarium* sp. altamente infectivo en planta.**

Una de las principales limitantes en la bioprospección de agentes biológicos para el manejo de fitopatógenos es la falta de reproducibilidad de los resultados en los ensayos de confrontación *in vitro*, al ser establecidos en campo o invernadero (Ngalimat et al., 2021). Para evaluar la capacidad antagónica contra *Fusarium* spp. de las bacterias aisladas en este trabajo se estableció un ensayo *in vivo* de confrontación en planta.

Las pruebas de patogenicidad en plantas de zarzamora y tomate mostraron que el aislado *Fus 6* podía generar un nivel de severidad de infección 2.6 a 4.8 veces mayor, respectivamente, que aislados como *Fus 3*. Estas pruebas permitieron seleccionar a *Fus 6* y tomate como los organismos modelo a utilizar en un bioensayo que permitiera evaluar el efecto antagónico de la cepa *P. megaterium* BAF3, seleccionada por su alta capacidad antagónica *in vitro*.

Las pruebas de patogenicidad permiten seleccionar variedades resistentes a ciertos patógenos en programas de fitomejoramiento (Sánchez-González et al., 2019 y Soto-Sedano et al., 2012), pero también se utilizan para evaluar la susceptibilidad o compatibilidad de hospederos de los patógenos (Pastrana et al., 2019).

Durante los ensayos de patogenicidad para la selección de planta modelo se observó que el uso de plantas provenientes de vivero en cuya producción no se ha tenido control de calidad puede presentar contaminación por otros microorganismos que generan variables no controlables; lo que se pudo corroborar con la recuperación de aislados de otros microorganismos a partir de las raíces de las plantas. Por ello se optó por utilizar plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*), provenientes de semilla certificada, la cual fue germinada y mantenida en condiciones *in vitro* durante la prueba de patogenicidad.

Además, el establecimiento de las pruebas de patogenicidad *in vitro* nos permitió realizar la evaluación de síntomas en un corto tiempo, utilizando las escalas de severidad de daños propuestas. Sin embargo, el bioensayo se estableció en macetas para permitir el desarrollo de las plantas, pero bajo estas condiciones las plantas mostraron alta tolerancia al fitopatógeno y no presentaron síntomas de enfermedad (al menos durante 90 días después de la inoculación).

No obstante, el análisis del nivel de infección radicular de *Fus 6* en las plantas de tomate fue significativamente menor en frecuencia e intensidad de infección cuando las plantas fueron inoculadas con *P. megaterium* BAF3 y el efecto antagónico fue mayor en los tratamientos en los que se inoculó *P. megaterium* BAF3 en tomate tres y ocho días previos a la inoculación con *Fus 6*, así como al aplicar una segunda dosis de *P. megaterium* BAF3 ocho días posteriores a una co-inoculación con la bacteria y *Fus 6*.

El método de inoculación juega un papel importante en el éxito de establecimiento de las PGPB al momento de inocularse en los cultivos (Afzal et al., 2012). Por ejemplo, Ortíz Texon et al. (2016), en un ensayo comparativo para determinar la efectividad entre diferentes métodos de aplicación de PGPB, observaron que la aplicación en drench del inóculo fue más efectiva en comparación con el testigo y la inmersión de raíces; ya que pudieron recuperar mayor UFC·g<sup>-1</sup> de raíz.

Además del método de inoculación, la respuesta de la planta a la inoculación de PGPB depende de la colonización de la raíz, que varía con la multiplicación y

distribución de los microorganismos a través de la rizósfera, el antagonismo microbiano, la humedad de suelo, el pH, la temperatura, el hospedero, los exudados de la raíz, así como el estado fisiológico de la planta (Msimbira & Smith, 2020).

El método de inmersión de raíz podría suponer un mayor éxito en la colonización de microorganismos ya que éstos están en contacto directo con la raíz; pero considerando que al momento del trasplante las condiciones de la rizósfera cambian abruptamente y se genera un estado de estrés en la planta; esto podría generar una disminución en la sobrevivencia y multiplicación celular de las bacterias, debido a su adaptación a un nuevo entorno.

Lopes et al. (2021) señala que uno de los factores que también puede favorecer la efectividad de los tratamientos al inocular PGPB de manera directa en el suelo es que los microorganismos entran en contacto con los exudados de la raíz, logrando una mejor adaptación al entorno de la rizosfera.

Por último, a pesar de que no observamos diferencia estadística entre los tratamientos inoculados de manera simultánea y los que se inocularon inicialmente con BAF 3 y posteriormente con el inóculo de patógeno de *Fusarium* sp., existen reportes que mencionan que una aplicación preventiva de los microorganismos si puede tener beneficios sobre el control de enfermedades. (Chen et al., 2000) en su estudio mencionan que la inoculación previa a que se establezca el patógeno sugiere ventajas debido a que los PGPB inoculados en sus tratamientos contra *Pythium aphanidermatum* en pepino, estimularon enzimas responsables de la respuesta de defensa de las plantas; la fenilalanina amonio liasa (PAL), peroxidasa (PO) y la polifenol oxidasa (PPO), además en el análisis nativo-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) de las expresiones de isoenzimas de peroxidasa en las raíces de pepino inducidas por las rizobacterias eran diferentes de las de las raíces infectadas con *P. aphanidermatum*, sugiriendo que los mecanismos de activación de peroxidasa por parte de las rizobacterias pueden ser diferentes de los de la infección por patógenos. Stoll et al. (2021) comparan diferentes estrategias de aplicación: manejo convencional (T1); aplicación de PGPB en plántulas (T2), aplicación post trasplante (T3) y una combinación de aplicación en plántula y post

transplante (T4); observaron que T2 y T4 mejoraron la tasa de supervivencia post transplante y aumentó la productividad de las plantas, concluyendo que las aplicaciones tempranas de cultivo, son una alternativa viable para el uso eficiente de inoculantes de PGPB. En comparación, la introducción tardía reduce el efecto benéfico sobre la productividad de los cultivos.

## CONCLUSIONES

- La estrategia de selección de bacterias edáficas por co-inoculación con *Fusarium* spp. *in vitro* y el proceso de selección posterior, permitió obtener cinco aislados bacterianos que disminuyen la incidencia del fitopatógeno en planta.
- Los cinco aislados son estreptobacilos Gram positivos, cuya caracterización molecular mostró que todos corresponden a cepas de *Priestia megaterium*.
- El nivel de antagonismo de las cinco cepas de *P. megaterium*, así como su patrón de crecimiento en medio líquido es distinto; sin embargo, mostraron capacidades metabólicas similares que podrían promover mecanismos de inhibición del crecimiento de *Fusarium* sp. o activar la respuesta sistémica inducida en plantas, así como promover el crecimiento de éstas.
- La planta modelo seleccionada para evaluar la capacidad antagónica de los aislados bacterianos fue tomate.
- La inoculación de las plantas con la cepa *P. megaterium* BAF3 disminuyó la incidencia de colonización de *Fusarium* sp. en la raíz.

## REFERENCIAS

- Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T. G., & Sessitsch, A. (2012). The inoculation method affects colonization and performance of bacterial inoculant strains in the phytoremediation of soil contaminated with diesel oil. *International Journal of Phytoremediation*, 14(1), 35–47. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.552928>
- Agrawal, T., & Kotasthane, A. S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India. *SpringerPlus*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-73>
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. In K. D. Sonnack (Ed.), *Plant pathology* (Quinta Edi, Vol. 948). Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.2307/3241295>
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9–21. <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.1.9>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ajilogba, C. F., & Babalola, O. O. (2013). Integrated management strategies for tomato fusarium wilt. *Biocontrol Science*, 18(3), 117–127. <https://doi.org/10.4265/bio.18.117>
- Akköprü, A., & Demir, S. (2005). Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. *Journal of Phytopathology*, 153(9), 544–550. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.01018.x>

- Ali, J., Sharma, D. C., Bano, A., Gupta, A., Sharma, S., Bajpai, P., & Pathak, N. (2018). Exploiting microbial enzymes for augmenting crop production. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00029-3>
- Allison C., M. G. T. (1990). Regulation of Protease Production in *Clostridium sporogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3485–3490.
- Alshelmani, M. I., Loh, T. C., Foo, H. L., Lau, W. H., & Sazili, A. Q. (2013). Characterization of cellulolytic bacterial cultures grown in different substrates. *The Scientific World Journal*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/689235>
- Appuhn, A., & Joergensen, R. G. (2006). Microbial colonisation of roots as a function of plant species. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.002>
- Asran, M. R., & Buchenauer, H. (2003). Pathogenicity of *Fusarium graminearum* isolates on maize (*Zea mays* L.) cultivars and relation with deoxynivalenol and ergosterol contents / Pathogenität von *Fusarium graminearum* Isolaten an Mais- (*Zea mays* L.) Sorten und Beziehung zu Deoxynivalenol- und Ergosterol-Gehalten. *Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(3), 209–219. <http://www.jstor.org/stable/43215506>
- Azizoglu, Z. B., Yilmaz, S., Azizoglu, U., Karabörklü, S., Temizgul, R., & Ayvaz, A. (2021). Molecular characterization of the chitinase genes of native *Bacillus thuringiensis* isolates and their antagonistic activity against three important phytopathogenic fungi. *Biologia*, 76(9), 2745–2755. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00802-0>
- Aznar, A., & Dellagi, A. (2015). New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: What can we learn from animals? *Journal of Experimental Botany*, 66(11), 3001–3010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv155>

- Bach, E., Rangel, C. P., Ribeiro, I. D. A., & Passaglia, L. M. P. (2022). Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. *Molecular Genetics and Genomics*, 297(4), 1063–1079. <https://doi.org/10.1007/s00438-022-01907-0>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233–266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Banerjee, A., Bareh, D. A., & Joshi, S. R. (2017). Native microorganisms as potent bioinoculants for plant growth promotion in shifting agriculture (Jhum) systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(1), 127–140. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017005000010>
- Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>
- Berg, S., Dennis, P. G., Paungfoo-Lonhienne, C., Anderson, J., Robinson, N., Brackin, R., Royle, A., DiBella, L., & Schmidt, S. (2020). Effects of commercial microbial biostimulants on soil and root microbial communities and sugarcane yield. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 565–580. <https://doi.org/10.1007/s00374-019-01412-4>
- Berlec, A. (2012). Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: Search for plant probiotics. *Plant Science*, 193–194, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.010>
- Cardona-Piedrahita, L. F., & Castaño-Zapata, J. (2019). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(167), 227.

<https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>

Chen, C., Bélanger, R. R., Benhamou, N., & Paulitz, T. C. (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(1), 13–23. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0243>

Coico, R. (2005). Gram Staining BASIC PROTOCOL Commonly Used Techniques. *Current Protocols in Microbiology*, 3–4.

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>

CONANP, C. N. de Á. N. P. (2014). *Programa de Manejo del Area de Protección de Flora y Fauna Pico de Tancitaro*. 196.

Connell, S. L., & Padgett, D. E. (1988). An improved technique for making permanent slide cultures of fungi. *Mycopathologia*, 101(3), 165–166. <https://doi.org/10.1007/BF00437034>

Cordero-Ramírez, J. D., López-Rivera, R., Figueroa-Lopez, A. M., Mancera-López, M. E., Martínez-Álvarez, J. C., Apodaca-Sánchez, M. Á., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2013). Native soil bacteria isolates in Mexico exhibit a promising antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Journal of Basic Microbiology*, 53(10), 838–847.

<https://doi.org/10.1002/jobm.201200128>

de la Torre-Hernández, M. E., Salinas-Virgen, L. I., Aguirre-Garrido, J. F., Fernández-González, A. J., Martínez-Abarca, F., Montiel-Lugo, D., & Ramírez-Saad, H. C. (2020). Composition, Structure, and PGPR Traits of the Rhizospheric Bacterial Communities Associated With Wild and Cultivated *Echinocactus platyacanthus* and *Neobuxbaumia polylopha*. *Frontiers in Microbiology*, *11*(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01424>

Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>

Delitte, M., Caulier, S., Bragard, C., & Desoignies, N. (2021). Plant Microbiota Beyond Farming Practices: A Review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.624203>

Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E. S. G., & Staver, C. P. (2018). Fusarium wilt of banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. *Frontiers in Plant Science*, *871*(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468>

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Critical Reviews in Plant Sciences Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere Plant Growth. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *22*(2), 107–149.

Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of fusarium oxysporum formae speciales and races. In *Phytopathology* (Vol. 109, Issue 4, pp. 512–530). American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>

Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd-Allah, E. F., & Hashem, A.

- (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Elieh-Ali-Komi D., hamblin M. (2016). Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res (Indore)*, 4(3), 411–427. <https://doi.org/10.2307/4145104>
- Elkoca, E., Kantar, F., & Sahin, F. (2008). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, 31(1), 157–171. <https://doi.org/10.1080/01904160701742097>
- Fan, P., Lai, C., Yang, J., Hong, S., Yang, Y., Wang, Q., Wang, B., Zhang, R., Jia, Z., Zhao, Y., & Ruan, Y. (2020). Crop rotation suppresses soil-borne Fusarium wilt of banana and alters microbial communities. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 0(0). <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1839058>
- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2011). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*, 17–46. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7>
- García-Gutiérrez C. and Rodríguez-Meza. (2012). PROBLEMÁTICA Y RIESGO AMBIENTAL POR EL USO DE PLAGUICIDAS EN SINALOA ENVIRONMENTAL. *Ra Ximhai*, 8(3), 41–49. <http://uaim.mx/webraximhai/Ej-26earticulosPDF/10-PROPUESTADEESTRATEGIAPARAELMEJORAMIENTOOLuzMaria.pdf>
- Glick, B. R. (2020). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (B. R. Glick (ed.); Segunda ed). Springer.
- Gohel, H. R., Contractor, C. N., Ghosh, S. K., & Braganza, V. J. (2014). A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar plates.

*International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 261–266.

Gordon, T. R., Kirkpatrick, S. C., Henry, P. M., Kong, M., & Broome, J. C. (2016). First report of a wilt disease of blackberry caused by fusarium oxysporum in California. *Plant Disease*, 100(5), 1018. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0784-PDN>

Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with sodium dodecyl sulfate: Minipreps. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(10), 911–916. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot093344>

Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct bacillus species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of robertmurraya kyonggiensis sp. nov. and proposal for an emended genus bacillus limiting it o. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>

Guzmán-Moreno, J., García-Ortega, L. F., Torres-Saucedo, L., Rivas-Noriega, P., Ramírez-Santoyo, R. M., Sánchez-Calderón, L., Quiroz-Serrano, I. N., & Vidales-Rodríguez, L. E. (2022). Bacillus megaterium HgT21: a Promising Metal Multiresistant Plant Growth-Promoting Bacteria for Soil Bioremediation. *Microbiology Spectrum*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00656-22>

Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1977). Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of micro organisms. *Journal of General Microbiology*, 98(1), 109–115. <https://doi.org/10.1099/00221287-98-1-109>

Hewitt, E. J., & Eden, A. (1953). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *The Analyst*, 78(926), 329–330. <https://doi.org/10.2136/sssaj1966.03615995003000040002x>

- Huang, C. J., Wang, T. K., Chung, S. C., & Chen, C. Y. (2005). Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(1), 82–88. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.1.082>
- Jochum, M. D., McWilliams, K. L., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Niu, G., Pierson, E. A., & Jo, Y. K. (2019). Bioprospecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Mitigate Drought Stress in Grasses. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02106>
- Kandaiah, R., & Ramasamy, M. (2015). Deproteinization of Distillery Yeast Biomass Waste by Protease-producing *Bacillus megaterium* PB 4. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 06(06), 2–10. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000319>
- Kende, H., & Zeevaart, J. A. D. (1997). The five “classical” plant hormones. *Plant Cell*, 9(7), 1197–1210. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1197>
- Khalil, M. M. R., Fierro-Coronado, R. A., Peñuelas-Rubio, O., Villa-Lerma, A. G., Plascencia-Jatomea, R., Félix-Gastélum, R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2021). Rhizospheric bacteria as potential biocontrol agents against *Fusarium* wilt and crown and root rot diseases in tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7460–7471. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.043>
- Khanna, A., Raj, K., Kumar, P., & Wati, L. (2022). Antagonistic and growth-promoting potential of multifarious bacterial endophytes against *Fusarium* wilt of chickpea. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00516-8>
- Kielak, A. M., Cretoiu, M. S., Semenov, A. V., Sørensen, S. J., & Van Elsas, J. D. (2013). Bacterial chitinolytic communities respond to chitin and pH alteration in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 263–272. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-12>

- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M., & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. In *Nature* (Vol. 286, Issue 5776, pp. 885–886). <https://doi.org/10.1038/286885a0>
- Kumar V. S., Menon S., A. H. and G. (2017). Characterization and optimization of bacterium isolated from soil samples for the production of siderophores. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.04.004>
- Landi, L., Renella, G., Giagnoni, L., & Nannipieri, P. (2011). *Activities of Proteolytic Enzymes*. 9, 247–260. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9.c11>
- Lau, E. T., Tani, A., Khew, C. Y., Chua, Y. Q., & Hwang, S. S. (2020). Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation. *Microbiological Research*, 240, 126549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126549>
- Leong, J. (1986). Siderophores: Their Role in the Biocontrol of Plant Pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 24, 187–209.
- Leslie, J. F. and S. B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (B. A. S. John F. Leslie (ed.); First edit). Blackwell Publishing.
- Lin, L., Wang, R., Wang, J., Cai, J., & Zhao, L. (2023). *Transcriptome profiling of genes regulated by phosphate-solubilizing bacteria Bacillus megaterium P68 in potato (Solanum tuberosum L.)*. April, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1140752>
- Liu, J. M., Liang, Y. T., Wang, S. S., Jin, N., Sun, J., Lu, C., Sun, Y. F., Li, S. Y., Fan, B., & Wang, F. Z. (2023). Antimicrobial activity and comparative metabolomic analysis of *Priestia megaterium* strains derived from potato and dendrobium. *Scientific Reports*, 13(1), 5272. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32337-6>
- Lopes, M. J. dos S., Dias-Filho, M. B., & Gurgel, E. S. C. (2021). Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers*

*in Sustainable Food Systems*, 5(February), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>

Maier, R. M., & Pepper, I. L. (2015). Bacterial Growth. In *Environmental Microbiology: Third Edition* (Issue I). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>

Mariscal, L. A., Rivera, A., Dávalos, P. A., & Ávila, D. (2017). Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria×ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, 51(6), 673–681.  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00673-en.pdf>

Martínez-Fernández, E., Martínez-Jaimes, P., Sánchez, D. G., & Peña-Chora, G. (2015). Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Micología*, 42, 33–43.

Matheron, M. E., & Porchas, M. (2010). Evaluation of soil solarization and flooding as management tools for *Fusarium* wilt of lettuce. *Plant Disease*, 94(11), 1323–1328. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-10-0296>

Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H. M., Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Bakker, P. A. H. M., & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097–1100.  
<https://doi.org/10.1126/science.1203980>

Mora-Sala, B., Cabral, A., León, M., Agustí-Brisach, C., Armengol, J., & Abad-Campos, P. (2018). Survey, Identification, and Characterization of *Cylindrocarpon*-Like Asexual Morphs in Spanish Forest Nurseries. *Plant Disease*, 102(11), 2083–2100. <https://doi.org/10.1094/pdis-01-18-0171-re>

Msimbira, L. A., & Smith, D. L. (2020). The Roles of Plant Growth Promoting Microbes in Enhancing Plant Tolerance to Acidity and Alkalinity Stresses.

*Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(July), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00106>

Nega, A. (2014). *Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens*. 4(27), 33–55.

Ngalimat, M. S., Hata, E. M., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Zainudin, N. A. I. M., Saidi, N. B., & Yusof, M. T. (2021). Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to manage bacterial rice pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 1–23.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040682>

Ortiz Texon, J. A., Martínez, J. D., de las Nieves Rodríguez Mendoza, M., & Zavala, G. C. (2016). Bacterial inoculation of five strawberry varieties in contrasting soil pH: Effect on growth and fruit quality. *Terra Latinoamericana*, 34(2), 177–185.

Pal y McSpadden, 2006. (2006). Biological control of plant root pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80042-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80042-5)

Pan, D., Mionetto, A., Tiscornia, S., & Bettucci, L. (2015). Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Research*, 31(3), 137–143.  
<https://doi.org/10.1007/s12550-015-0224-8>

Parra-Cota, F. I., Coronel-Acosta, C.-B., Amézquita-Avilés, C. F., De los Santos-Villalobos, S., & Escalante-Martínez, D. I. (2018). Diversidad metabólica de microorganismos edáficos asociados al cultivo de maíz en el Valle del Yaqui, Sonora. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2), 431–442.  
<https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1083>

Pastrana A. M., Kirkpatrick S. C., Kong M., B. J. C. and G. T. R. (2019). *Fusarium Oxysporum* f. sp. *mori*, a new *forma specialis* causing Fusarium wilt of blackberry. *Phytopathology*, 109(5), 1–26.  
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/epdf/10.1094/PHYTO-11-18-0418-R>

Patel, P., Shah, R., & Modi, K. (2017). Isolation and characterization of plant growth

- promoting potential of *Acinetobacter* sp. RSC7 isolated from *Saccharum officinarum* cultivar Co 671. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(4), 483–491. [https://doi.org/10.18006/2017.5\(4\).483.491](https://doi.org/10.18006/2017.5(4).483.491)
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-IN18. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C., & Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109(7), 731–742. <https://doi.org/10.1023/A:1026034509247>
- Sajeed Ali, S., & Vidhale, N. (2013). Bacterial Siderophore and their Application: A review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(12), 303–312. <http://www.ijcmas.com>
- Sánchez-González, E. I., Gutiérrez-Soto, J. G., Olivares-Sáenz, E., Gutiérrez-Díez, A., Barrientos-Priego, A. F., & Ochoa-Ascencio, S. (2019). Screening progenies of Mexican race avocado genotypes for resistance to *Phytophthora cinnamomi* races. *HortScience*, 54(5), 809–813. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13552-18>
- Sanders, E. R. (2012). Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *Journal of Visualized Experiments*, 63, 1–18. <https://doi.org/10.3791/3064>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Shanmugam, V., & Kanoujia, N. (2011). Biological management of vascular wilt of

- tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control*, 57(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.001>
- Song, W., Zhou, L., Yang, C., Cao, X., Zhang, L., & Liu, X. (2004). Tomato *Fusarium* wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protection*, 23(3), 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.007>
- Soto-Sedano, J. C., Clavijo Ortiz, M. J., & Filgueira Duarte, J. J. (2012). Phenotypic evaluation of the resistance in F1 carnation populations to vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Evaluación fenotípica de la resistencia a *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 30(2), 172–178.
- Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Srinivasan, M., Petersen, D. J., & Holl, F. B. (1996). Influence of indoleacetic acid-producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(10), 1006–1014. <https://doi.org/10.1139/m96-129>
- Stoll, A., Salvatierra-Martínez, R., González, M., Cisternas, J., Rodríguez, Á., Vega-Gálvez, A., & Bravo, J. (2021). Importance of crop phenological stages for the efficient use of PGPR inoculants. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98914-9>
- Sumalan, R. M., Alexa, E., & Poiana, M. A. (2013). Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and *Fusarium* mycotoxins production in

- wheat. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-32>
- Summerell, B. A. (2019). *Annual Review of Phytopathology Resolving Fusarium: Current Status of the Genus*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718>
- Swiontek Brzezinska, M., Kalwasińska, A., Świątczak, J., Żero, K., & Jankiewicz, U. (2020). Exploring the properties of chitinolytic Bacillus isolates for the pathogens biological control. *Microbial Pathogenesis*, 148(August). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104462>
- Syed Nabi, R. begum, Shahzad, R., Tayade, R., Shahid, M., Hussain, A., Ali, M. W., & Yun, B. W. (2021). Evaluation potential of PGPR to protect tomato against Fusarium wilt and promote plant growth. *PeerJ*, 9(April). <https://doi.org/10.7717/peerj.11194>
- Tolozza-Moreno, D. L., Lizarazo-Forero, L. M., & Uribe-Vélez, D. (2020). Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (*Physalis peruviana* L.) for biological control of *Fusarium oxysporum*. *Tropical Plant Pathology*, 45(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00313-z>
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Ba-Surto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Current situation of *Fusarium* spp in the control and evaluation of the an-tifungal activity on vegetables extracts. *Acta Agronomica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Vranova, V., Rejsek, K., & Formanek, P. (2013). Proteolytic activity in soil : A review. *Applied Soil Ecology*, 70, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.04.003>
- Wang, B., & Jeffers, S. N. (2000). *Fusarium* root and crown rot: A disease of container-grown hostas. *Plant Disease*, 84(9), 980–988. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.980>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal

DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>