



Identification and antagonistic activity *in vitro* isolation of bacteria against fungi of agricultural important

Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de bacterias contra hongos de importancia agrícola

De Dios Avila, N.¹, Ríos Velasco, C.², Luna Esquivel, G.³, Cambero Campos, O. J.³, Cambero Ayón, C. B.¹, Estrada-Virgen, M. O.^{3*}

¹Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias; Carretera Tepic-Compostela Km. 9. Xalisco, Nayarit; México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Cuauhtémoc, Av. Río Concho s/n Parque Industrial, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua; México.

³Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura; Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155. Xalisco, Nayarit; México.

Cite this paper/Como citar este artículo: De Dios Avila, N., Ríos Velasco, C., Luna Esquivel, G., Cambero Campos, O. J., Cambero Ayón, C. B., Estrada-Virgen, M. O. (2020). Identification and antagonistic activity *in vitro* isolation of bacteria against fungi of agricultural important. *Revista Bio Ciencias* 7, e803. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e803>



ABSTRACT

Due to the excessive use of chemical molecules in the control of diseases that cause ecological imbalances, effects on human health and environment damage, the implementation of biological control strategies for the management of phytosanitary problems is a sustainable option. In order to generate alternatives that contribute to the sustainable management of crops in Nayarit, Mexico, antagonistic bacteria collected from the rhizosphere of the Hass avocado agroecosystem (January to December 2014) were isolated. We obtained 10 bacterial isolates, four belonging to *B. subtilis*, four to *B. amyloliquefaciens*, one to *Bacillus* sp. and one identified as *Burkholderia cepacia*. The percentage of inhibition of radial growth (PIRG) of these isolates was estimated when confronted

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: August 23th 2019.

Accepted/Aceptado: February 10th 2020.

Available on line/Publicado: February 13th 2020.

*Corresponding Author:

Estrada Virgen, Mario Orlando. Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155, Xalisco, Nayarit; México. Phone: +52(311) 211 1163. E-mail: estra0288@gmail.com

RESUMEN

Debido al uso desmedido de moléculas químicas en el control de enfermedades que provocan desequilibrios ecológicos, efectos en la salud humana y daños ambientales, la implementación de estrategias de control biológico para el manejo de problemas fitosanitarios es una opción sustentable. Para generar alternativas que contribuyan a la gestión sostenible de los cultivos en Nayarit, México, se aislaron e identificaron bacterias antagónicas de suelo de la rizosfera de agroecosistemas de aguacate Hass (recolectadas de enero a diciembre de 2014). Se obtuvieron 10 aislados bacterianos: cuatro pertenecientes a *B. subtilis*, cuatro a *B. amyloliquefaciens*, una *Bacillus* sp. y una perteneciente a *Burkholderia cepacia*. Se estimó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIRG) de estos aislados, al confrontarse *in vitro* contra los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Collectotrichum* sp. principales hongos de importancia económica en México. El PIRG de las cepas bacterianas sobre *P. cinnamomi* fluctuó de 42.25 a 70.24 %, de 33.2 a 56.33 % para *F. oxysporum* y de 35 a 64.43 % para

in vitro against *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* sp. which are of economic importance in Mexico. The PIRG of the bacterial isolates on *P. cinnamomi* ranged from 42.25 to 70.24 %, 33.2 to 56.33 % for *F. oxysporum* and 35 to 64.43 % for *Colletotrichum* sp. The results showed the potential of the bacteria evaluated on *P. cinnamomi*, *F. oxysporum*, and *Colletotrichum* sp.

KEY WORDS

Bacillus, inhibition, antagonism, phytopathogenic fungi, biocontrol.

Introduction

Most of the worldwide diseases in crops are mainly caused by fungi, bacteria, viruses, and nematodes. These are responsible for large economic losses by the decrease of the quality of the product or the total loss of the crop when the severity is high. However, fungi are the major cause of crop damage in agricultural activities (Rios *et al.*, 2016).

The management of diseases in crops depends on the application of chemical fungicides (APEAM, 2019). Some of them are known for their negative impacts on the environment and even on human health, as well as in the development of fungicide-resistant strains of fungal plant pathogen due to the strong selection pressure and to the loss of biodiversity in agroecosystems. Given the social pressure to obtain safe food, the search for alternatives for crop disease management has been intensified (Fisher *et al.*, 2012; Gerbore *et al.*, 2014). Cultural and genetic alternatives stand out among the available options, and recently, the use of biological control agents with emphasis on native antagonistic microorganisms such as bacterial strains (Zeilinger & Omann, 2007; Andrade *et al.*, 2015) as sustainable alternatives in disease management (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Among the antagonistic microorganisms, bacteria such as *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Serratia* and *Bacillus* (Suárez & Rangel, 2013; Zavaleta *et al.*, 2015), are a promising alternative due to their antagonistic ability against a wide variety of phytopathogens because of the production of various antimicrobial compounds and

Colletotrichum sp. Los resultados mostraron el potencial de las bacterias evaluadas sobre *P. cinnamomi*, *F. oxysporum* y *Colletotrichum* sp.

PALABRAS CLAVE

Bacillus, inhibición, antagonismo, hongos fitopatógenos, control biológico.

Introducción

La mayoría de las enfermedades en los cultivos del mundo son causadas principalmente por hongos, bacterias, virus y nematodos, éstos son responsables de cuantiosas pérdidas económicas, debido a la disminución de la calidad del producto o la pérdida total del cultivo cuando la severidad es alta. Sin embargo, los hongos, son con mayor frecuencia los causantes del daño a los cultivos (Rios *et al.*, 2016).

El manejo de enfermedades en los cultivos, depende básicamente de la aplicación de fungicidas químicos (APEAM, 2019), algunos de estos conocidos por sus impactos negativos al ambiente e incluso a la salud de trabajadores agrícolas y consumidores; así como en el desarrollo de hongos patógenos resistentes a los fungicidas sintéticos usados en respuesta a la fuerte presión de selección, además de la pérdida de la biodiversidad en los agroecosistemas. Ante la presión social por obtener alimentos inocuos, se ha intensificado la búsqueda de alternativas para el manejo de enfermedades en cultivos agrícolas (Fisher *et al.*, 2012; Gerbore *et al.*, 2014), entre ellas destacan las culturales y genéticas, y recientemente, el uso de agentes de control biológico con énfasis en microorganismos antagonistas nativos como cepas bacterianas (Zeilinger & Omann, 2007; Andrade *et al.*, 2015), esto como alternativas sustentables en el manejo de enfermedades (Ait-Lahsen *et al.*, 2001). Dentro de estas, las bacterias antagónicas como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Serratia* y *Bacillus* (Suárez & Rangel, 2013; Zavaleta *et al.*, 2015), son una alternativa prometedora por su capacidad antagónica contra una gran variedad de fitopatógenos debido a la producción de diversos compuestos antimicrobianos y por sus múltiples efectos positivos sobre las plantas como promotoras del crecimiento vegetal (Kloepper *et al.*, 2004; Carreras, 2011; Pliego *et al.*, 2011).

for the multiple positive effects on plants as promoters of plant growth (Kloepper *et al.*, 2004; Carreras, 2011; Pliego *et al.*, 2011).

The species of the genus *Bacillus* are the most widely distributed and studied due to their antagonistic capacity against a great variety of phytopathogens (Pozo *et al.*, 2007; Leelasuphakul *et al.*, 2008). The bacteria have been isolated from different habitats, generally associated with the rhizosphere of plant tissues, where *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans* and *B. subtilis* stand out. *B. subtilis* is the most commonly used as a phytopathogenic antagonist (Cazorla *et al.*, 2007; Tendulkar *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2010; Rios *et al.*, 2014). Although the urgent need for new alternatives in Mexico exists, few commercial products for the biological control of phytopathogens can be found, and that fact that whether the antagonistic microorganisms from these products are native or exotic is mostly unknown (Zavaleta *et al.*, 2015). Therefore, the objective of the study was to identify and evaluate the *in vitro* antifungal activity of bacterial isolates against fungi of economic importance for Mexico.

Material and methods

Location of the experimental site.

The antagonistic bacteria were isolated from soil samples (500–600 g), associated with the rhizosphere of Hass avocado trees (10–15 cm depth). Sampling was carried out from January to December 2014 (Rios *et al.*, 2014), in 20 commercial orchards in the municipalities of Tepic and Xalisco, Nayarit, Mexico (Table 1). The samples were transferred in polyethylene bags (Ecobags® 20 × 30 cm) to the Agricultural Parasitology Laboratory of the Multidisciplinary Center for Scientific Research (CEMIC) of the Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) and stored at 4 °C, until further use.

Isolation and identification of bacteria.

For the isolation and identification of bacteria, the soil samples from each orchard were homogenized and a 10 g sub-sample was taken, placed in 90 mL of sterile distilled water, kept under constant stirring for 30 min. Subsequently, a 1 mL aliquot was taken and placed in a test tube with 9 mL of sterile distilled water. Serial dilutions until 10⁻³, 10⁻⁴ and 10⁻⁵ were performed, and 80 µL were taken and deposited in duplicate in 90 mm

Las especies del género *Bacillus* son las más ampliamente distribuidas y estudiadas debido a su capacidad antagonista contra una gran variedad de fitopatógenos (Pozo *et al.*, 2007; Leelasuphakul *et al.*, 2008). Se han aislado de diferentes hábitats, generalmente asociadas a la rizosfera o a tejidos de plantas, donde destaca *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. circulans* y *B. subtilis*; esta última, como la más utilizada como antagonista de fitopatógenos (Cazorla *et al.*, 2007; Tendulkar *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2009; Mehta *et al.*, 2010; Rios *et al.*, 2014). A pesar de la necesidad urgente de nuevas alternativas, en México, existen pocos productos comerciales disponibles para el control biológico de fitopatógenos, de los cuales se desconoce en su mayoría si los microorganismos antagonistas son nativos o exóticos (Zavaleta *et al.*, 2015). Por lo tanto, el objetivo del estudio fue identificar y evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de aislados bacterianos contra hongos de importancia económica para México.

Material y Métodos

Ubicación del sitio experimental.

Las bacterias antagonistas, se aislaron de muestras de suelo (500–600 g), asociado a la rizosfera de árboles de aguacate Hass (10–15 cm profundidad). Los muestreos se realizaron de enero a diciembre del 2014 (Rios *et al.*, 2014), en 20 huertos comerciales de los municipios de Tepic y Xalisco, Nayarit, México (Tabla 1). Las muestras se trasladaron en bolsas de polietileno (Ecobolsas® 20 × 30 cm) al Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro Multidisciplinario de Investigación Científica (CEMIC) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) donde fueron almacenadas a 4 °C, hasta su procesamiento.

Aislamiento e identificación de bacterias.

Para el aislamiento e identificación de bacterias, se homogeneizaron las muestras de suelo de cada huerto y se tomó una sub-muestra de 10 g, se colocó en 90 mL de agua destilada estéril, se mantuvo en agitación constante por 30 min. Subsecuentemente, se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones consecutivas, hasta obtener las diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵, de las cuales se tomaron 80 µL y se depositaron por duplicado en cajas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) y se homogenizaron mediante la técnica de difusión (Guigón & González, 2004). Se incubaron a 28 °C, hasta observar crecimiento bacteriano. Las colonias bacterianas

Table 1.
The geographic location of avocado orchards of the municipalities of Nayarit, Mexico.

Tabla 1.
Huertos de aguacate muestreados, ubicación geográfica de los municipios de Nayarit, México.

Municipalities					
Xalisco			Tepic		
Locality	Geographic location	Altitude (mamsl)	Locality	Geographic location	Altitude (mamsl)
Emiliano Zapata	21°22'50" N 104°56'01" O	1,191	Camichin III	21°29'57" N 104°46'39" O	1,022
Curva	21°22'11" N 104°53'38" O	1,033	Camichin II	21°29'31" N 104°47'22" O	1,006
Xalisco	21°26'00" N 104°54'11" O	1,002	Libertad	21°31'44" N 105°01'29" O	1,008
Tacote	21°24'46" N 104°55'35" O	1,129	Yerba	21°31'27" N 105°02'45" O	850
Cuarenteño	21°27'49" N 105°01'38" O	1,118	Guayabitos	21°31'11" N 104°59'51" O	1,120
Carbonera	21°27'40" N 105°00'28" O	1,423	Venustiano Carranza	21°31'00" N 104°58'58" O	1,099
Xalisco U.A.A.	21°25'32" N 104°53'31" O	977	Ahuacate	21°31' 03" N 104°56'26" O	978
Tezcalate	21°31'44" N 105°01'29" O	1,030	Fortuna	21°32'47" N 104°56'33" O	862
Comunidad Indígena	21°23'35" N 104°53'46" O	1,027	Tintilagua	21°29'02" N 104°46'38" O	1,148
Pantanal	21°25'54" N 104°52'16" O	952	Noria	21°30' 33" N 104°58'20" O	1,254

* mamsl: meters above sea level.

* mamsl: metros sobre el nivel del mar.

diameter Petri dishes containing Papa Dextrose Agar culture medium (PDA) and then homogenized using the diffusion technique (Guigón & González, 2004). Petri dishes were incubated at 28 °C until bacterial growth was observed. Bacterial colonies that showed inhibition against fungi or other bacteria that grew in Petri dishes were isolated and grew in PDA at 48 h at 28 °C. Bacterial identification was carried out by analyzing the sequence of the 16S rDNA region. To perform this, genomic DNA (gDNA) of the bacteria was extracted with the ZR Fungal/bacterial DNA Miniprep™ (Zymo Research, Irving CA, USA) commercial kit based on the manufacturer's instructions. The quality and quantity of DNA were determined by spectrophotometry at O.D. 260 nm. The integrity of the

que mostraron inhibición contra hongos u otras bacterias que crecieron en las cajas de Petri se aislaron y crecieron en PDA a las 48 h a 28 °C. La identificación bacteriana se llevó a cabo mediante el análisis de la secuencia de la región 16S rDNA. Para lo cual, el DNA genómico (DNAg) de las bacterias fue extraído con el kit comercial ZR Fungal/bacterial DNA Miniprep™ (Zymo Research, Irving CA, USA) con base en las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad de DNA fue determinada mediante espectrofotometría a D.O. 260 nm. La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. La región ribosomal 16S de cada uno de los aislados bacterianos se amplificó mediante la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos FD1 (5'-TCGTC-GACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y RD1 (5'-CC-CGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Las

DNA was evaluated by electrophoresis in 1 % agarose gels. The 16S ribosomal region of each of the bacterial isolates was amplified by PCR, using primers FD1 (5'-TCGTGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and RD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3').

The PCR amplification conditions were carried out at 94 °C for 2 min (1 cycle), 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1.5 min (35 cycles), with a final extension at 72 °C for 5 min. The amplified PCR products were purified with the Gen Elute PCR Clean-up kit (Sigma, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing was done by the Institute of Biotechnology UNAM (IBT-UNAM, Morelos, Mexico). The sequences of the bacterial isolates were compared with the Ribosomal Database Project (RDP) and NCBI GenBank databases using BLAST to verify the percentage of identity corresponding to the species.

***In vitro* assays of antifungal activity.**

The antagonistic capacity of the 10 isolated bacterial strains of avocado rhizosphere against *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* sp., fungi obtained from the microorganisms collection of the CEMIC, were evaluated by means of *in vitro* confrontations by a diffusible medium with the four-quadrant test. The isolates of *B. methylotrophicus* (Bm-10) and *B. amyloliquefaciens* (Ba-01) included in these assays were provided by the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. These strains have been previously reported with potential for the control of phytopathogenic fungi. (Rios *et al.*, 2014).

The confrontations of bacteria against fungi were carried out according to the methodology described by Rios *et al.* (2014) with modifications. Five mm diameter fungus disks (unquantified conidia) of eight days of growth were placed in the center of the Petri dish containing PDA. The antagonistic bacterium was inoculated the same day in the four cardinal points of the Petri dish, with disks of PDA of the same diameter of fungi with bacterial growth of 72 h. The controls consisted of a 5 mm diameter fungus disk in PDA in the absence of bacterial isolates.

The Petri dishes were incubated at 28 °C in a bioclimatic chamber (Novatech Ei45) and systematic measurements were made every 24 h for 10 d of the radial growth of the fungi colonies and antagonistic bacteria in confrontation and

condiciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo a 94 °C por 2 min (1 ciclo), 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, y 72 °C por 1.5 min (35 ciclos), con una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR amplificados fueron purificados con el Kit Gen Elute PCR Clean-up kit (Sigma, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación fue hecha por el Instituto de Biotecnología UNAM (IBT-UNAM, Morelos, México). Las secuencias de los aislados bacterianos fueron comparadas con las bases de datos del Ribosomal Database Project (RDP) y NCBI GenBank, usando el algoritmo de BLAST para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a la especie.

Ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica.

La capacidad antagonista de las 10 cepas bacterianas aisladas de rizosfera de aguacate contra *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum* sp., hongos obtenidos del cepario de microorganismos del CEMIC, se evaluaron mediante confrontaciones *in vitro* por medios difusibles con la prueba de cuatro cuadrantes. Los aislados de *B. methylotrophicus* (Bm-10) y *B. amyloliquefaciens* (Ba-01) incluidas en estos ensayos fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Dichas cepas han sido reportadas previamente con potencial para el control de hongos fitopatógenos (Rios *et al.*, 2014).

Con respecto a las confrontaciones de bacterias contra hongos, se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Rios *et al.* (2014) con modificaciones. Se colocaron explantes de 5 mm de diámetro de hongo (conidios sin cuantificar) de ocho días de crecimiento, en el centro de la caja de Petri conteniendo PDA, la bacteria antagonista fue inoculada el mismo día, en los cuatro puntos cardinales de la caja de Petri con explantes de PDA del mismo diámetro de los hongos con crecimiento bacteriano de 72 h de edad. Los testigos consistieron en explantes de los hongos de 5 mm de diámetro crecidos en PDA en ausencia de los aislados bacterianos.

Las cajas se incubaron a 28 °C en una cámara bioclimática (Novatech Ei45) y se realizaron mediciones sistemáticas cada 24 h por 10 d, del crecimiento radial de las colonias de los hongos y bacterias antagonistas en confrontación y de los testigos. La capacidad antifúngica de los aislados bacterianos se determinó con base en el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIRG) de acuerdo a la fórmula $PIRG = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 fue el radio del hongo testigo y R2 fue el radio del hongo en la confrontación con los antagonistas (Ezziyani *et al.*, 2004).

the controls. The antifungal capacity of bacterial isolates was determined based on the percentage of radial growth inhibition (PIRG) according to the PIRG formula = $(R1 - R2) / R1 \times 100$, where R1 was the radius of the control fungus and R2 was the radius of the fungus in the confrontation with the antagonists (Ezziyani *et al.*, 2004).

A completely randomized design was used for the statistical analysis. The experiment consisted of 12 treatments (isolated from antagonistic bacteria), confronted with three putatively phytopathogenic fungi, besides of control for each fungus, where each repetition consisted of three Petri dishes (experimental units). All evaluations were performed in triplicate. The PIRG and halo inhibition data were analyzed with analysis of variance (ANOVA) using the Statistical Analysis System version 9.0 (SAS, 2002). Tukey test ($p=0.05$) was used for means comparison.

Results and Discussion

Ten bacterial isolates were obtained, mainly corresponding to the *Bacillus* genus according to their morphological characters. The morphological identity was verified by means of sequence comparison from the obtained in this research with those recorded in the NCBI GenBank and RDP (Table 2). The municipality of Tepic presented the highest frequency of isolates of antagonistic bacteria, a strain belonging to *Burkholderia cepacia*, one to *Bacillus* sp., three to *B. amyloliquefaciens* and three to *B. subtilis*, while in the municipality of Xalisco two isolates were obtained, one of *B. amyloliquefaciens* and another of *B. subtilis*.

Antagonistic activity of bacterial isolates against phytopathogens.

According to the *in vitro* confrontations, it was determined that the 10 bacterial isolates showed antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* sp. (Figure 1). The Bc-02 and Ba-05 isolates identified as *B. cepacia* and *B. amyloliquefaciens*, respectively, showed the highest inhibition capacity of 70.24 % and 61.08 % on *P. cinnamomi*, while the Bm-10 isolate identified as *B. amyloliquefaciens* showed the lowest PIRG (42.25 %) against *P. cinnamomi* (Figure 1A). Additionally, a reduction of 9.1 mm/day in the mycelial growth rate of *P. cinnamomi* with the Bc-02 isolate was observed.

Para el análisis estadístico, se utilizó un diseño completamente al azar, el experimento consistió en 12 tratamientos (aislados de bacterias antagonistas), confrontados contra tres hongos putativamente fitopatógenos, además de un testigo para cada hongo, donde cada repetición constó de tres cajas de Petri (unidades experimentales). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado. Los datos del PIRG y halo de inhibición se analizaron mediante el paquete estadístico Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002), para el análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron separadas con la prueba de Tukey ($p=0.05$).

Resultados y Discusión

Se obtuvieron 10 aislados bacterianos, la mayoría correspondió al género *Bacillus* de acuerdo con sus caracteres morfológicos. Mediante la comparación de las secuencias obtenidas de estos aislados bacterianos con las registradas en el NCBI GenBank y RDP, se corroboró su identidad morfológica previa (Tabla 2). El municipio de Tepic presentó la mayor frecuencia de aislamientos de bacterias antagonicas, una cepa perteneciente a *Burkholderia cepacia*, una a *Bacillus* sp., tres a *B. amyloliquefaciens* y tres a *B. subtilis*, mientras que en el municipio de Xalisco se obtuvieron dos aislados, una de *B. amyloliquefaciens* y otra de *B. subtilis*.

Actividad antagonica de aislados bacterianos contra fitopatógenos.

De acuerdo con las confrontaciones *in vitro*, se determinó que los 10 aislados bacterianos obtenidos, mostraron actividad antagonica contra *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum* sp. (Figura 1). Los aislados Bc-02 y Ba-05, identificados como *B. cepacia* y *B. amyloliquefaciens*, respectivamente mostraron la mayor capacidad de inhibición 70.24 % y 61.08 % sobre *P. cinnamomi*, mientras que el aislado Bm-10 identificado como *B. amyloliquefaciens* mostró el menor PIRG (42.25 %) contra *P. cinnamomi* (Figura 1A). Adicionalmente, se observó una reducción en la tasa de crecimiento micelial de *P. cinnamomi* con el aislado Bc-02 de 9.1 mm/día.

Los ensayos *in vitro* de los aislados Ba-05 y Bs-11 contra *F. oxysporum* mostraron inhibiciones de 33 % a 56.33 % con reducciones en su tasa de crecimiento de 7.33 mm/día, respectivamente (Figura 1B). Los aislados Bs-11 y Bs-

Tabla 2.
Molecularly identified antagonistic bacteria from the rhizosphere of commercial avocado orchards in the municipalities of Tepic and Xalisco, Nayarit, Mexico.

Tabla 2.
Bacterias antagonistas identificadas molecularmente aisladas de rizosfera de huertos comerciales de aguacate de los municipios de Tepic y Xalisco, Nayarit, México.

Origen/Locality	Key of the isolated	Molecular identification
Ahuacate	Bc-02	<i>Burkholderia cepacia</i>
Camichin II	Ba-12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Camichin III	Bsp-03	<i>Bacillus</i> sp.
Carbonera	Ba-04	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Comunidad Indígena	Bs-06	<i>Bacillus subtilis</i>
Fortuna	Bs-11	<i>Bacillus subtilis</i>
Guayabitos	Bs-09	<i>Bacillus subtilis</i>
Noria	Bs-07	<i>Bacillus subtilis</i>
Noria	Ba-05	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Yerba	Ba-08	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

In vitro assays of Ba-05 and Bs-11 isolates against *F. oxysporum* showed inhibitions of 33 % to 56.33 % with reductions in their growth rate of 7.33 mm/day, respectively (Figure 1B). The Bs-11 and Bs-06 isolates identified as *B. subtilis* showed inhibitions greater than 63.24 % on *Colletotrichum* sp., while the *B. cepacia* isolate (Bc-06) showed the lowest inhibition (35.72 %) compared to the control (Figure 1C). In this fungus, a reduction in the mycelial growth rate of 10.47 mm/day was observed when confronted with the isolated Bs-11 of *B. subtilis*.

Of the 10 bacterial isolates obtained from the rhizosphere of avocado trees, 90 % belonged to the *Bacillus* genus and 10 % to the *Burkholderia* genus. These results coincide with those obtained by Pozo et al. (2007) who isolated bacteria from different regions of Havana, Cuba, with a large number of strains corresponding to the *Bacillus* spp genus. Garbeva et al. (2003) in studies of the microbiota of agricultural soils determined that approximately 95 % of the DNA belonged to the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*. The Bc-02 isolate of *B. cepacia* showed the highest growth inhibition (70.24 %) on *P. cinnamomi*, followed by Ba-05 and Bs-06 isolates belonging to *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*, with growth inhibitions of 61.08 % and 57.54 %, respectively. These results coincide with

06 identificadas como *B. subtilis* mostraron inhibiciones superiores al 63.24 % sobre *Colletotrichum* sp., mientras que el aislado *B. cepacia* (Bc-06) mostró la menor inhibición (35.72 %) con respecto al testigo (Figura 1C). En este hongo, se observó una reducción en la tasa de crecimiento micelial 10.47 mm/día al confrontarse con el aislado Bs-11 de *B. subtilis*.

De los 10 aislados bacterianos obtenidos de rizosfera de árboles de aguacate, 90 % perteneció al género *Bacillus* y el 10 % al género *Burkholderia*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pozo et al. (2007) quienes aislaron bacterias de diferentes regiones de la Habana, Cuba, con un gran número de cepas correspondientes al género *Bacillus* spp. Garbeva et al. (2003) en estudios de la microbiota de suelos agrícolas, determinaron que aproximadamente el 95 % del DNA presente en estos, pertenecía a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. El aislado Bc-02 de *B. cepacia* mostró la mayor inhibición de crecimiento (70.24 %) sobre *P. cinnamomi*, seguida por los aislados Ba-05 y Bs-06 pertenecientes a *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, con inhibiciones de crecimiento de 61.08 % y 57.54 %, respectivamente. Estos resultados coinciden con Ezziyyani et al. (2004), quienes reportaron a *B. cepacia* con una inhibición de *Phytophthora capsici* del 81 % a las 96 h y a los 8 d fue sobrecrecida por la bacteria. Este aislado tiene potencial de uso como agente de control biológico

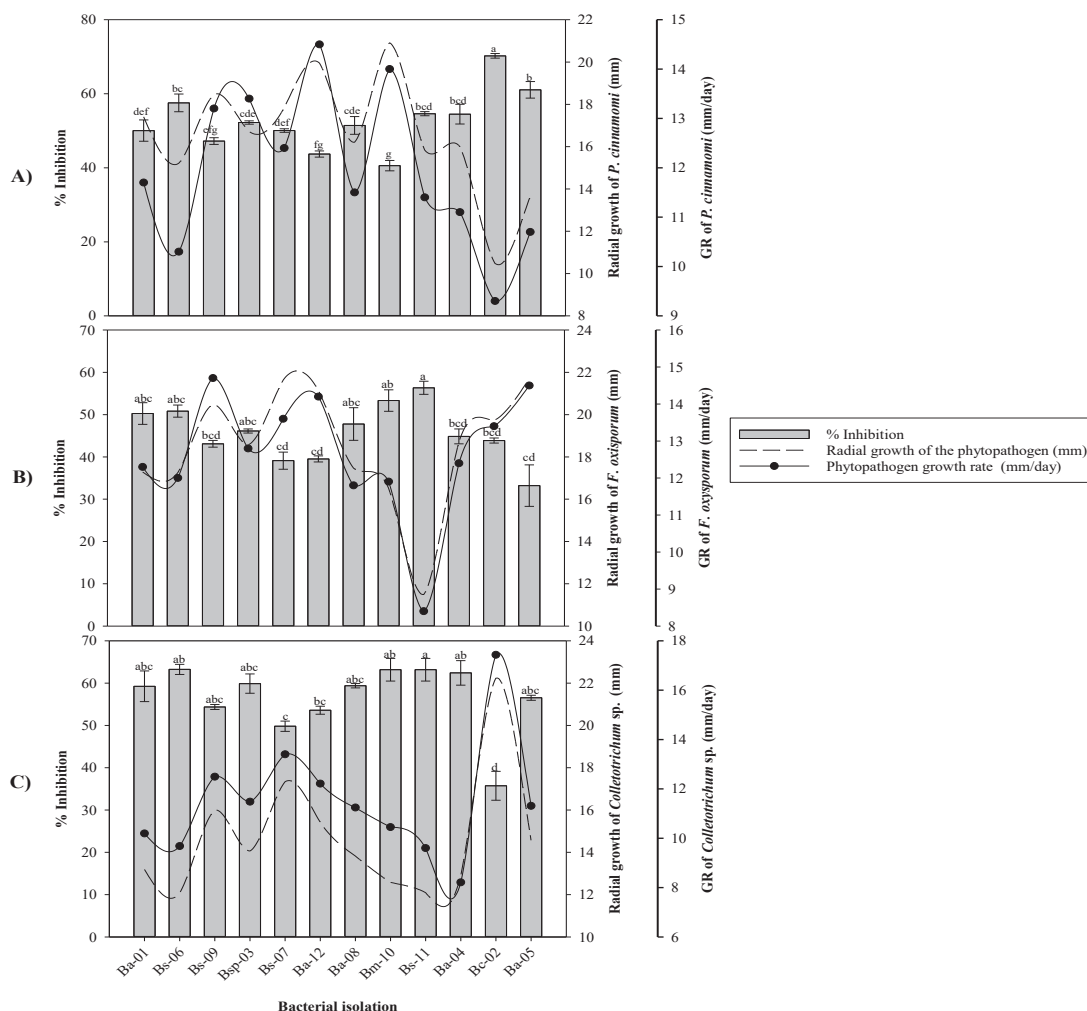


Figure 1. Antifungal effect of bacterial strains on radial growth, growth rate and percentage of mycelial inhibition of A) *Phytophthora cinnamomi*, B) *Fusarium oxysporum* and C) *Colletotrichum* sp. * GR= Growth rate. Values with the same letter are statistically equal according to the Tukey test ($p=0.05$).

Figura 1. Efecto antifúngico de cepas bacterianas en el crecimiento radial, tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial de A) *Phytophthora cinnamomi*, B) *Fusarium oxysporum* y C) *Colletotrichum* sp. * GR= Tasa de crecimiento. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba Tukey ($p=0.05$).

Ezziyani *et al.* (2004), who reported *B. cepacia* with a *Phytophthora capsici* inhibition of 81 % at 96 h and at 8 d was overgrowth by the bacteria. This isolate has the potential to be used as a biological control agent for phytopathogens due to its high inhibitory capacity attributed to the production of secondary metabolites such as pyrrolnitrine, altericidine, cepacin, among other volatile and non-volatile compounds (Kraus & Loper,

de fitopatógenos, por su alta capacidad inhibitoria atribuida a la producción de metabolitos secundarios como pirrolnitrina, altericidina, cepacina, entre otros compuestos volátiles y no volátiles (Kraus & Loper, 1995; Rosales *et al.*, 1995; El-Banna *et al.*, 1998; De La Fuente *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 2006).

La inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* y *Colletotrichum* sp., inducida por los aislados de *Bacillus*

1995; Rosales *et al.*, 1995; El-Banna *et al.*, 1998; De La Fuente *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 2006).

Growth inhibition of *F. oxysporum* and *Colletotrichum* sp., induced by *Bacillus* spp. was significantly different. These differences could be due to the ability of each isolate to produce antimicrobial compounds such as bacillomycin, mycosubtilin, fungimycin and zwittermicin that inhibit the growth of various microorganisms including fungi (Pal & Gardener, 2006; Madhaiyan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). In this regard, Edwards *et al.* (1994) mention that antibiosis is the most common mode of action in the *Bacillus* genus. *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* sp. showed growth inhibitions of 56.33 % and 64.43 %, induced by the Bs-11 isolate of *B. subtilis*. Corrales *et al.* (2011) reported this species with an *in vitro* inhibition of 71.71 % on *Fusarium* spp. Kim *et al.* (2010) reported the production of fractions of iturin A and fengicin by a strain of *B. subtilis* when confronted against *Colletotrichum gloeosporioides*.

Iturin group antibiotics are secreted by most strains of *Bacillus* spp. and inhibit mycelial growth and sporulation of the fungus by altering membrane permeability and fungal cell lipid composition (Romero *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009).

The inhibitions showed by *Bacillus methylotrophicus* (Bm-10) on *Fusarium* sp. (53.32 %) and *Colletotrichum* spp. (63.16 %), were similar to those reported by Rios *et al.* (2016). In this regard, Madhaiyan *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2012), showed that *B. methylotrophicus* has antifungal ability against a great diversity of phytopathogenic fungi.

Bacillus methylotrophicus (Bm-10) and *B. subtilis* (Bs-11) showed the highest antifungal capacity against the three fungi, which could be due to the production of antibiotics and/or volatile compounds such as hydrogen cyanide, which has been reported as one of the responsible for the inhibition of the growth of phytopathogenic fungi, besides of the harmful effects on the *in vitro* growth of several phytopathogens by affecting the activity of specific fungal enzymes (Wheatley, 2002; Duffy *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). In this regard, Souto *et al.* (2004) reported that the antifungal ability of *B. amyloliquefaciens* when confronted *in vitro* is due to the production and release of peptides and lipopeptides into the culture medium, such as fungicine, iturin, bacillomycin, among others. Determine the

spp. fue significativamente diferente, estas diferencias pudieron deberse a la capacidad de cada aislado para producir compuestos antimicrobianos como bacilomicina, micosubtilina, fungimicina y zwittermicina que inhiben el crecimiento de diversos microorganismos incluidos los hongos (Pal & Gardener, 2006; Madhaiyan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Al respecto, Edwards *et al.* (1994) menciona que la antibiosis es el modo de acción más común en el género *Bacillus*.

Fusarium oxysporum y *Colletotrichum* sp. mostraron inhibiciones en su crecimiento de 56.33 % y 64.43 %, inducidos por el aislado Bs-11 de *B. subtilis*. Corrales *et al.* (2011) reportaron a esta especie con una inhibición *in vitro* del 71.71 % sobre *Fusarium* spp. Kim *et al.* (2010) reportaron la producción de fracciones de iturina A y fengicina por una cepa de *B. subtilis* al confrontarse contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Los antibióticos del grupo Iturin son secretados por la mayoría de las cepas de *Bacillus* spp. e inhiben el crecimiento micelial y la esporulación del hongo al alterar la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica de la célula fúngica (Romero *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Las inhibiciones mostradas por *Bacillus methylotrophicus* (Bm-10) sobre *Fusarium* sp. (53.32 %) y *Colletotrichum* spp. (63.16 %), fueron similares a lo reportado por Rios *et al.* (2016). Al respecto, Madhaiyan *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2012), demostraron que *B. methylotrophicus* tiene capacidad antifúngica contra una gran diversidad de hongos fitopatógenos.

Bacillus methylotrophicus (Bm-10) y *B. subtilis* (Bs-11) mostraron la mayor capacidad antifúngica contra los tres hongos, lo cual pudiera deberse a la producción de antibióticos y/o compuestos volátiles como cianuro de hidrógeno, que se ha reportado como uno de los responsables de la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, además de sus efectos nocivos en el crecimiento *in vitro* de varios fitopatógenos al afectar la actividad de enzimas fúngicas específicas (Wheatley, 2002; Duffy *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012). Al respecto, Souto *et al.* (2004) reportaron que la capacidad antifúngica de *B. amyloliquefaciens* al ser confrontada *in vitro* se debe a la producción y liberación de péptidos y lipopéptidos al medio de cultivo, tales como fungicina, iturina, bacilomicina, entre otros. Conocer la capacidad antagonista de las cepas bacterianas sobre los diferentes fitopatógenos es de gran interés, ya que algunas cepas evaluadas en nuestro estudio mostraron mayor capacidad antifúngica

antagonistic capacity of bacterial strains on the different phytopathogens is of great interest since some strains evaluated in our study showed greater *in vitro* antifungal capacity against *P. cinnamomi* and less effective when confronted with *F. oxysporum* (Figure 1B). These results show the variability between isolates due to the specificity of antibiotics produced by bacteria (Schippers *et al.*, 1987). Besides the fungal defense mechanisms.

Conclusion

In rhizospheric soils of avocado orchards in Nayarit, diversity of bacterial strains exists, since we identified species of *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia* and *Bacillus* sp. with an *in vitro* antagonistic capacity against *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* sp. Some of these bacteria could be potential candidates to be included in integrated management schemes of the three fungi of agricultural interest studied.

Acknowledgments

To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and Universidad Autónoma de Nayarit.

References

- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., de la Cruz, J., Monte, E. and Llobell, A. (2001). An antifungal exo- α -1, 3-glucanase (AGN13. 1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology*, 67(12): 5833-5839. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5833-5839.2001>
- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K. and Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 519. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9>
- Andrade-Hoyos, P., Molina Gayosso, E., De León, C., Barquera, E., de la Cruz, M., Alvarado Rosales, D. and López Jiménez, A. (2015). Mecanismos de defensa en portainjertos de aguacate ante *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(2): 347-360. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342015000200010&script=sci_arttext&tlng=en
- APEAM (Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de México, A. C.). (2019). Listado de fungicidas recomendados para el cultivo de aguacate. <https://plaguicidas.apeamac.com/Fungicidas.aspx>
- Carreras, S. (2011). Aplicaciones de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2): ISSN 0122-8706. <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945031006.pdf>
- Cazorla, F., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B., Vicente, A. d. and Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1950-1959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>
- Corrales, L. C., Sánchez, L. C., Cuervo, J., Bautista, D., González, L. y Guevara, M. (2011) Evaluación del efecto

in vitro contra *P. cinnamomi* y menor efecto al confrontarse con *F. oxysporum* (Figura 1B). Estos resultados muestran la variabilidad existente entre aislados, debido a la especificidad de los antibióticos producidos por bacterias (Schippers *et al.*, 1987). Además de los mecanismos de defensa propios de los hongos.

Conclusión

En suelos rizosféricos de huertos de aguacate en Nayarit, existe diversidad de cepas bacterianas, ya que se identificaron las especies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia* y *Bacillus* sp. con capacidad antagónica *in vitro* contra *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum* sp. Algunas de estas podrían ser candidatas potenciales para incluirse en esquemas de manejo integrado de los tres hongos de interés agrícola estudiados.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Universidad Autónoma de Nayarit.

- biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédica. 8 (13): 63-75
- Correa, O. S., Montecchia, M. S., Berti, M. F., Ferrari, M. C. F., Pucheu, N. L., Kerber, N. L. and García, A. F. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 41(2): 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.10.007>
- De la Fuente, L., Bajsa, N., Bagnasco, P., Quagliotto, L., Thomashow, L. and Arias, A. (2001). Antibiotic production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 421-429.
- Duffy, B., Schouten, A. and Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1): 501-538. https://www.researchgate.net/profile/Brion-Duffy/publication/40128372_Pathogen_self_defense_mechanisms_to_counteract_microbial_antagonism/links/53ee05e00cf26b9b7dc63f94.pdf
- Edwards, S., McKay, T. and Seddon, B. (1994). Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi. Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. *Ecology of Plant Pathogens*, 101-118.
- El-Banna, N., & Winkelmann, G. (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1): 69-78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00473.x>
- Ezziyyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L. and Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. Paper presented at the *Anales de Biología*. <https://revistas.um.es/analesbio/article/view/30471>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. and Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393): 186. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Garbeva, P., Van Veen, J. and Van Elsas, J. (2003). Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microbial Ecology*, 45(3): 302-316. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2034-8>
- Gerbore, J., Vallance, J., Yacoub, A., Delmotte, F., Grizard, D., Regnault-Roger, C. and Rey, P. (2014). Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonize the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1): 153-167. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12380>
- Guigón López, C. & González González, P. A. (2004). Selección de cepas nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1): 117-124. https://www.researchgate.net/profile/Cesar-Guigon-Lopez/publication/242615786_Seleccion_de_Cepas_Nativas_de_Trichoderma_spp_con_Actividad_Antagonica_sobre_Phytophthora_capsici_Leonian_y_Promotoras_de_Crecimiento_en_el_Cultivo_de_Chile_Capsicum_annuum_L_/links/0046353605cf28f89b000000/Seleccion-de-Cepas-Nativas-de-Trichoderma-spp-con-Actividad-Antagonica-sobre-Phytophthora-capsici-Leonian-y-Promotoras-de-Crecimiento-en-el-Cultivo-de-Chile-Capsicum-annuum-L.pdf
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H. and Chi, Y.-T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1): 138-145. <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M. and Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11): 1259-1266. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259>
- Kraus, J. & Loper, J. E. (1995). Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 849-854. <https://aem.asm.org/content/61/3/849.short>
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P. and Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1): 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.024>
- Li, J., Yang, Q., Zhao, L.-h., Zhang, S.-M., Wang, Y.-X. and Zhao, X.-Y. (2009). Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(4): 264-272. <https://doi.org/10.1631/jzus. B0820341>
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S.-W. and Sa, T.-M. (2010). *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing,

- plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10): 2490-2495. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.015487-0>
- Mehta, P., Chauhan, A., Mahajan, R., Mahajan, P. K. and Shirkot, C. K. (2010) Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Current Science*. 98(4): 538-542. 2010. <https://www.jstor.org/stable/24111705?seq=1>
- Pal, K. & Gardener, B. (2006). The plant health Instructor in biological control of plant pathogens, Constable, London. English, 206p.
- Pliego, C., Ramos, C., de Vicente, A. and Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and Soil*, 340(1-2): 505-520. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0615-8>
- Pozo, Y. R., Flores, D. V., Romero, L. C., Pérez, E. G. and Álvarez-Rivera, V. P. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11(1): 35-40. <http://www.fitosanidad.cu/index.php/fitosanidad/article/view/246>
- Quan, C., Zheng, W., Liu, Q., Ohta, Y. and Fan, S. (2006). Isolation and characterization of a novel *Burkholderia cepacia* with strong antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(6): 1276-1284. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0425-3>
- Rios Velasco, C., Caro Cisneros, J., Berlanga Reyes, D., Ruiz Cisneros, M., Ornelas Paz, J., Salas Marina, M. and Guerrero Prieto, V. (2016). Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1): 85-99. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Rios, V. C., Ruiz, M. F. C., Berlanga, D. I. R., Acosta, C. H. M., Ornelas, J. J. P., Romo, A. C., Salas, M. A. M. and Ibarra, J. E. R. (2014) Enfermedades radiculares de árboles de manzano (*Malus domestica* Borkh) y su manejo en huertos del estado de Chihuahua. Boletín técnico generado en el proyecto 362, CIAD, A. C. Fundación Produce Chihuahua. 54 p.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E. and Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4): 430-440. <https://doi.org/10.1094 / MPMI -20-4-0430>
- Rosales, A., Thomashow, L., Cook, R. and Mew, T. (1995). Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85(9): 1028-1032. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1028>
- SAS INSTITUTE. SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC. 2002.
- Schippers, B., Bakker, A. W. and Bakker, P. A. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25(1): 339-358.
- Souto, G., Correa, O., Montecchia, M., Kerber, N., Pucheu, N., Bachur, M. and Garcia, A. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6): 1247-1256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>
- Suárez, C. L. Y. y Rangel, R. A. L. (2013) Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica*. 62 (4): 370-378.
- Tendulkar, S., Saikumari, Y., Patel, V., Raghoutama, S., Munshi, T., Balam, P. and Chattoo, B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6): 2331-2339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03501.x>
- Wheatley, R. (2002). The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4): 357-364. <https://doi.org/10.1023/A:1020592802234>
- Zavaleta, M. E., Bravo, L. L. and Guigón, L. C. (2015). Fitopatógenos con origen en el suelo *In*: Arredondo, B. H. C., Rodríguez Casos de Control Biológico en México, (2), B. L. A. Biblioteca Básica de Agricultura. 2015: 65-91.
- Zeilinger, S. & Omann, M. (2007). *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology*, 1: 227-234. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S397>
- Zhang, Q.-L., Liu, Y., Ai, G.-M., Miao, L.-L., Zheng, H.-Y. and Liu, Z.-P. (2012). The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology*, 108: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.139>