

In vitro antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*

Biocontrol *in vitro* de *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi* con antagonistas

Sarahi Rubio-Tinajero, Eduardo Osorio-Hernández*, Benigno Estrada-Drouaillet, José Hugo Tomás Silva-Espinosa, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Centro Universitario Adolfo López Mateos, C.P. 87140, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México; Ma. De Lourdes Rodríguez-Mejía, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología, Carretera México - Texcoco Km. 38.5, 56230 Texcoco de Mora, México; Raúl Arnulfo Nava-Juárez, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI), Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62730. Autor para correspondencia: eosorio@docentes.uat.edu.mx.

Recibido: 09 de Abril, 2021.

Aceptado: 20 de Julio, 2021.

Rubio-Tinajero S, Osorio-Hernández E, Estrada-Drouaillet B, Silva-Espinosa JHT, Rodríguez-Mejía MDL and Nava-Juárez RA. *In vitro* antagonist biocontrol of *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. Mexican Journal of Phytopathology 39(3).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-1>

Primera publicación DOI: 10 de Agosto, 2021.

First DOI publication: August 10, 2021.

Resumen. El objetivo fue evaluar el efecto antagonístico *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* y dos aislados de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi*. Se identificó morfológicamente a *Bacillus*, aislado de muestras de suelo de plantaciones de *Aloe vera* y se realizó una confrontación de cultivos duales modificada, colocando en el centro de la caja Petri *F. oxysporum* y en

Abstract. The objective was to evaluate the antagonistic effect *in vitro* of native strains of *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum* and two isolates of *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi*. *Bacillus*, isolated from soil samples of *Aloe vera* plantations, was morphologically identified and a modified dual culture confrontation was carried out, placing the *F. oxysporum* in the center of the Petri dish and *Bacillus* in the four cardinal points; it was arranged under a completely randomized experimental design with five repetitions, the variables registered were percentage of antagonism, inhibition halo and concentration of conidia. For *Trichoderma* they were confronted against *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi* with a dual confrontation, a percentage of inhibition and antagonism classification were determined. In the confrontation of *T. asperellum* it obtained a percentage of inhibition of 70.5% against *F. oxysporum* and 41.9% against *D.*

los cuatro puntos cardinales las bacterias de *Bacillus*; para esto se dispuso bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones, las variables registradas fueron porcentaje de antagonismo, halo de inhibición y concentración de conidios. Para *Trichoderma* se confrontaron frente a *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi* con una confrontación dual y se determinó porcentaje de inhibición y clasificación de antagonismo. En la confrontación de *T. asperellum* obtuvo un porcentaje de inhibición de 70.5 % frente a *F. oxysporum* y 41.9 % frente a *D. chrysanthemi*. En cuanto a los halos de inhibición de *Bacillus* (B5 y B4) obtuvieron 4 mm. En la concentración de conidios B5 mostró 1.3, B4 2.6 y el testigo 12.6 esporas por dilución. *Trichoderma* y *Bacillus* representan una alternativa viable para el control de *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi*.

Palabras claves: Control biológico, hongo, bacteria, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *Bacillus* spp.

El *Aloe vera* es un cultivo de gran importancia económica y relevancia para la agricultura y la industria en el mundo. México destaca como principal país productor y exportador de materia prima de sábila (Álvarez *et al.*, 2012). Tamaulipas es considerado el estado con mayor producción en el país y una superficie de siembra que va en aumento; sin embargo, se ha detectado la presencia de microorganismos fitopatógenos (Rubio *et al.*, 2020). Una de las limitantes que aumentan las pérdidas y afectan los rendimientos se deben al ataque de *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Pectobacterium* spp. (Jiménez, 2015), de los cuales *F. oxysporum* se considera uno de los hongos fitopatógenos en *Aloe vera*, causante de la podredumbre de la base del tallo, amarillamiento, marchitamiento de las hojas y por consiguiente la muerte de la planta. Por otra parte, el género *Erwinia* se reportan en diferentes

chrysanthemi. Regarding the inhibition halos of *Bacillus* (B5 and B4), they obtained 4 mm. In the conidia concentration B5 showed 1.3, B4 2.6 and the control 12.6 spores per dilution. *Trichoderma* and *Bacillus* represent a viable alternative for the control of *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi*.

Key words: Biological control, fungus, bacteria, *T. asperellum*, *T. harzianum*, *Bacillus* spp.

Aloe vera is a crop of great economic importance and relevance to agriculture and industries around the world, and Mexico stands out as the main producing and exporting country of aloe raw material (Álvarez *et al.*, 2012). Tamaulipas is considered the state with the highest production rate in the country and a production surface area on the rise, although the presence of phytopathogenic microorganisms has been found (Rubio *et al.*, 2020). One of the limitations that increase losses and affect yields is the attack of *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. and *Pectobacterium* spp. (Jiménez, 2015), one of which, *F. oxysporum*, is considered as one of the phytopathogenic fungi in aloe that causes rotting of the stem base, yellowing, wilting of the leaves and therefore, the death of the plant. On the other hand, the genus *Erwinia* is reported in several areas of the world as the causal agent of bacterial rot in roots, stem and leaves of *Aloe* spp. (Rubio *et al.*, 2020).

Diseases caused by phytopathogens are controlled using chemical products and the most common active ingredients against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* are Carbendazim, Mancozeb, Fosetyl-Al, Hymexazol, Chinosol and Metalaxyl-M + Mancozeb (Mannai *et al.*, 2018). However, the use of agrochemicals has caused several controversies due to their high costs, toxicity levels and environmental damages (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Due to this,

partes del mundo como agente causal de la pudrición bacteriana en raíz, tallo y hojas del *Aloe* spp. (Rubio *et al.*, 2020).

Las enfermedades causadas por fitopatógenos son controladas mediante productos químicos y los ingredientes activos más comunes contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *F. oxysporum* son Carbendazim, Mancozeb, Fosetyl-Al, Hymexazol, Chinosol y Metalaxyl-M + Mancozeb (Mannai *et al.*, 2018). Sin embargo, el empleo de agroquímicos, ha generado diversas controversias debido a sus altos costos, toxicidad y daños ambientales (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Debido a esto se han buscado alternativas de control biológico, puesto que no genera efecto residual y contaminación (Pappas *et al.*, 2020). Existe un grupo importante de microorganismos que presentan efectos antagónicos frente a otros microorganismos fitopatógenos (Sánchez-León y Bustos, 2020), entre los que destacan *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* spp. que se caracterizan por ser microorganismos que muestran efectos antagónicos (Fiorentino *et al.*, 2016). Por ejemplo, *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* se han utilizado por poseer mecanismos de acción contra *Fusarium solani* (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021). Además, tiene efecto antagónico frente a bacterias fitopatógenas pectolíticas ya que es capaz de inhibirlas un 32.4% (Astorga-Quirós *et al.*, 2014). Lo cual podría deberse gracias a sus propiedades enzimáticas, ya que secreta proteasas, quitinasas y glucanasa, que dañan la pared celular del hongo fitopatógeno causando una lisis que facilita el micoparasitismo (Ribeiro *et al.*, 2019). Por otro lado, *Bacillus* spp. es capaz de inducir crecimiento en plantas, aun cuando esta tenga su sistema radicular afectado por *Fusarium* spp. (Castro *et al.*, 2019). Además, se han reportado antagonismo en la confrontación de *B. subtilis* frente a *Fusarium* spp. (Solano-Báez *et al.*, 2021), ya que produce antibióticos y enzimas, así también ayuda a

searches for biological control alternatives have been carried out, since they produce no residual effects or contamination (Pappas *et al.*, 2020). There is an important group of microorganisms that display antagonistic effects on other phytopathogenic microorganisms (Sánchez-León and Bustos, 2020), including *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp., which characteristically display antagonistic effects (Fiorentino *et al.*, 2016). For example, *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* have been used for their action mechanisms against *Fusarium solani* (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021). It also has an antagonistic effect against pectolytic phytopathogenic bacteria, since it is able to inhibit them by 32.4% (Astorga-Quirós *et al.*, 2014). This may be due to its enzymatic properties, since it secretes proteases, chitinases and glucanase, which damage the cell wall of the phytopathogenic fungus, causing a lysis that facilitates mycoparasitism (Ribeiro *et al.*, 2019). On the other hand, *Bacillus* spp. can induce growth in plants, even when their root systems have been affected by *Fusarium* spp. (Castro *et al.*, 2019). Antagonism has also been reported in the confrontation of *B. subtilis* with *Fusarium* spp. (Solano-Báez *et al.*, 2021), since it produces antibiotics and enzymes and also helps in the solubilization of phosphates and the biological fixation of nitrogen (Miljaković *et al.*, 2020). Due to this, the aim of this investigation was to determine the antagonistic effect of native strains of *Bacillus* spp., *T. asperellum* and *T. harzianum* against *F. oxysporum* and *Dickeya chrysanthemi* under *in vitro* conditions.

The tests were carried out in the microbiology lab of the Central Integral de Laboratorios (CILO), in the Faculty of Engineering and Sciences of the Autonomous University of Tamaulipas in August, 2019. Native, previously identified microorganisms were used, which were a part of the ceparium of the microbiology laboratory: *T.*

la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno (Miljaković *et al.*, 2020). Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antagónico de cepas nativas de *Bacillus* spp., *T. asperellum* y *T. harzianum* frente a *F. oxysporum* y *Dickeya chrysanthemi* bajo condiciones de *in vitro*.

Las pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología de la Central Integral de Laboratorios (CILO), en la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas en agosto del 2019. Se utilizaron microorganismos nativos previamente identificados, pertenecientes al cepario del laboratorio de microbiología: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi* que fueron aislados de lotes con plantas de *Aloe barbadensis*.

Para obtener aislados de *Bacillus* se procedió a la recolección de muestras de suelo, se usó el método de cinco de oros, obteniendo cinco muestras de suelo de 1 kg de dos lotes de plantaciones de *Aloe vera* en la localidad de Padilla, Tamaulipas (23° 59' 26.1" N, 98° 56' 39.0" W). De cada muestra se tomaron 10 g de suelo y se resuspendieron en 90 mL de agua destilada estéril, se realizaron diluciones seriadas hasta 1×10^{-3} y fue sometida a un tratamiento térmico de 85 °C durante 15 min, posteriormente se extrajeron 100 µL y se inocularon en medio papa dextrosa agar (PDA), se incubaron a 27 ± 1 °C durante un lapso de 24 a 48 h, transcurrido este tiempo se obtuvieron colonias de bacterias de morfología variada, las cuales fueron seleccionadas por sus características de inhibición.

Cada especie fue descrita macroscópicamente de acuerdo a la morfología de las colonias, forma, borde, elevación, superficie, tamaño, color, consistencia y acompañado de un registro fotográfico; además, se determinó su morfología celular mediante la tinción Gram y el tipo de pared de las especies a las 24 y 48 h de incubación, con el fin de

asperellum, *T. harzianum*, *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi*, which were isolated from plots with *Aloe barbadensis* plants.

In order to obtain *Bacillus* isolations, samples were collected from the soil using the five of gold method, and five samples were taken from 1 kg of soil from two *Aloe vera* plantations in Padilla, Tamaulipas (23° 59' 26.1" N, 98° 56' 39.0" W). From each sample, 10 g of soil were taken and resuspended in 90 mL of sterile distilled water; serial dilutions were performed until 1×10^{-3} and it underwent a thermal treatment at 85 °C for 15 min. Next, 100 µL were extracted and inoculated in a potato-dextrose-agar (PDA) medium, incubated at 27 ± 1 °C for 24 to 48 h, after which bacterial cultures of varied morphologies were obtained, which were chosen for their inhibition characteristics.

Each species was described macroscopically according the morphology of the cultures: shape, edges, elevation, surface, size, color, consistency, and a photograph was also taken; in addition, its cell morphology was determined by Gram's staining, with the type of cell walls, after 24 and 48 h of incubation, in order to observe the microscopic morphology at 100X (Calvo and Zúñiga, 2010). Once the presence of bacterial endospores was verified, a sample was taken and placed in nutritious agar (AN) for 24 h to 27 ± 1 °C. Tests were carried out for maltose, xylose, mannitol, citrate use, starch hydrolysis de starch, gelatin hydrolysis, growth in NaCl at 7% and growth in anaerobic agar in order to identify *B. subtilis* cultures following the methodology proposed by Reinoso *et al.* (2006). To determine the bacterial species following the methodology by Schaad *et al.* (2001), the bacteria were tested to see if they were able to hydrolyze gelatin, starch, as well as using sugars, citrate and alcohols.

The antagonistic ability of *Bacillus* spp. (B4 and B5) against *F. oxysporum* was evaluated with

observar la morfología microscópica a 100X (Calvo y Zúñiga, 2010). Una vez que se comprobó la presencia de endosporas bacterianas, se tomó una muestra y se colocó en agar nutritivo (AN) durante 24 h a 27 ± 1 °C. Se realizaron las pruebas de maltosa, xilosa, manitol, utilización de citrato, hidrólisis de almidón, hidrólisis de gelatina, crecimiento en NaCl al 7% y crecimiento en agar anaerobio con el fin de identificar colonias de *B. subtilis* según la metodología propuesta por Reinoso *et al.* (2006). Para determinar las especies de bacterias de acuerdo con la metodología de Schaad *et al.* (2001), las bacterias fueron sometidas a pruebas para ver si eran capaces de hidrolizar gelatina, almidón, así como utilizar azúcares, citrato y alcoholes.

La capacidad antagonista de *Bacillus* spp. (B4 y B5) frente a *F. oxysporum* fue evaluada mediante dos tratamientos (B4 y B5) con cinco repeticiones cada uno a dos temperaturas de incubación. Para esto, se utilizó la metodología modificada de Corrales *et al.* (2011), que consistió en la siembra de *F. oxysporum* en el centro de las cajas Petri con medio PDA y AN; para el caso de *Bacillus* spp. se colocaron en los cuatro puntos cardinales. Para el caso del testigo solo se inóculo *F. oxysporum*. Enseguida se incubaron a 25 ± 1 °C y 27 ± 1 °C. Posteriormente, se midió el crecimiento radial de *F. oxysporum* cada 24 h, hasta que llenó la caja Petri y con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y se empleó la fórmula utilizada por Ávila *et al.* (2020) y, según los resultados se estableció la escala propuesta por Corrales *et al.* (2011). Además, se determinó el número de esporas, para ello se tomó un fragmento de medio PDA con *F. oxysporum* y se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de agua estéril, posteriormente se agitó durante 3 min, se realizó un conteo en una cámara de Neubauer y los resultados fueron sometidos a una comparación de medias.

Para *T. asperellum* y *T. harzianum* se colocaron 5 mm de micelio activo a 4 cm de distancia de

two treatments (B4 and B5) with five repetitions each at two incubation temperatures. In order to do this, the methodology by Corrales *et al.* (2011) was used, with modifications, which consisted in planting *F. oxysporum* in the center of the Petri dishes with PDA medium and AN. For the case of *Bacillus* spp., it was placed in the four cardinal points. In the case of the control, only *F. oxysporum* was inoculated. Afterwards, they were incubated at 25 ± 1 °C and 27 ± 1 °C. Next, the mycelial growth of *F. oxysporum* was measured every 24 h until it filled the Petri dish and using the data obtained, the percentage of root growth inhibition (PICR) was calculated, and the formula used by Ávila *et al.* (2020) was used. Based on the results, the scale proposed by Corrales *et al.* (2011) was established. In addition, the number of spores was determined by taking a piece of PDA medium with *F. oxysporum*, which was then placed in a test tube with 1 mL of sterile water. It was shaken for 3 min, then the spores were counted in a Neubauer chamber; the results underwent a comparison of means.

For *T. asperellum* and *T. harzianum*, 5 mm of active mycelium was placed 4 cm away from *F. oxysporum*. For the controls, *F. oxysporum* was planted in the center of the Petri dishes, incubated at 25 ± 1 °C for 10 days and measurements were taken of the radial growth of the fungi every 24 h. The antagonism of *T. asperellum* and *T. harzianum* was evaluated with the percentage of inhibition, with the formula used by Ávila *et al.* (2020). In addition, the level of antagonism was determined according to the scale used by Bell *et al.* (1982).

To evaluate the antagonistic ability of *Bacillus* spp. against *D. chrysanthemi*, two treatments, B4 and B5, were established. The methodology consisted in using a 5 mm hole puncher to punch holes into the Petri dishes with AN medium. On the side, sterile AN was mixed with bacteria from the treatments (B4 and B5) at a concentration of 1×10^6 UFC and the holes in the four cardinal points

F. oxysporum. Para los testigos se sembró *F. oxysporum* en el centro de las cajas Petri y se incubaron a 25 ± 1 °C por 10 días y se realizaron mediciones cada 24 h del crecimiento radial de los hongos. El antagonismo de *T. asperellum* y *T. harzianum* se evaluó mediante el porcentaje de inhibición empleando la fórmula utilizada por Ávila *et al.* (2020). Además, se determinó el nivel de antagonismo de acuerdo a la escala utilizada por Bell *et al.* (1982).

Para evaluar la capacidad antagonista de *Bacillus* spp. frente a *D. chrysanthemi* se establecieron dos tratamientos B4 y B5. La metodología consistió en utilizar un sacabocado de 5 mm con la que se hicieron cuatro huecos en las cajas Petri con medio AN, aparte se preparó AN estéril mezclado con las bacterias de los tratamientos (B4 y B5) a una concentración de 1×10^6 UFC, se realizó el rellenado de los huecos en los cuatro puntos cardinales. Posteriormente, las cajas se incubaron a 25 ± 1 °C durante 24 h, se preparó una suspensión de *D. chrysanthemi* a una concentración de 1×10^6 UFC en un atomizador y se aplicó en cada tratamiento por aspersión. La variable a evaluar fue el halo de inhibición, y se midió el crecimiento cada 24 h durante una semana. Por otro lado, para medir la capacidad antagonista de *T. harzianum* y *T. asperellum* (TJ y TP) frente a *D. chrysanthemi* se utilizó la metodología de Corrales *et al.* (2011) con modificaciones, la cual consistió en colocar los aislados de *D. chrysanthemi* el centro de las cajas Petri y los de *Trichoderma* spp. en los cuatro puntos cardinales, para el testigo solo se inóculo *D. chrysanthemi* en el centro de la caja Petri y se incubaron a 25 ± 1 °C. Se realizaron mediciones del crecimiento radial de las colonias de *D. chrysanthemi* cada 24 h hasta que llenó la caja Petri. Posteriormente, se empleó la fórmula utilizada por Ávila *et al.* (2020) para el cálculo del porcentaje de inhibición y se ubicó la escala de Bell *et al.* (1982).

El análisis estadístico de las confrontaciones de antagonismo de *Bacillus* spp. frente a *F. oxysporum*;

were filled. Next, the dishes were incubated at 25 ± 1 °C for 24 h, a suspension of *D. chrysanthemi* was prepared at a concentration of 1×10^6 UFC in a spray bottle and sprayed onto each treatment. The variable to evaluate was the inhibition halo and growth was measured every 24 h for one week. On the other hand, to measure the antagonistic ability of *T. harzianum* and *T. asperellum* (TJ and TP) against *D. chrysanthemi*, the methodology by Corrales *et al.* (2011) was used, with modifications, which consisted in placing the *D. chrysanthemi* isolations in the center of the Petri dishes and the *Trichoderma* spp. isolations in the four cardinal points. For the control, *D. chrysanthemi* was only inoculated in the center of the Petri dish and they were all incubated at 25 ± 1 °C. Measurements of the radial growth of the *D. chrysanthemi* cultures were taken every 24 h until the Petri dish was full. Later, the formula used by Ávila *et al.* (2020) was used to calculate the percentage of inhibition and it was located on the scale by Bell *et al.* (1982).

The statistical analysis of the antagonistic confrontations between *Bacillus* spp. and *F. oxysporum*; *T. asperellum* and between *T. harzianum* and *D. chrysanthemi* and *F. oxysporum* were submitted to a covariance analysis test (ANCOVA). In the case of *Bacillus* spp. against *D. chrysanthemi*, an analysis of variance was used (ANOVA), as was the case for counting spores from the confrontations between *Bacillus* spp. and *F. oxysporum* with a temperature of 27 ± 1 °C. In order to find differences between treatments, Tukey's comparison of means ($P < 0.05$) was applied using the SAS statistical package SAS (version 9.0).

Twelve bacterial cultures with a variety of morphologies were isolated and two bacteria were selected (B4 and B5) for their inhibition characteristics, which displayed macroscopic characteristics of the *Bacillus* genus, producing whitish, large, extended and irregular cultures. They were Gram positive, with a bacillar shape,

T. asperellum y *T. harzianum* frente a *D. chrysanthemi* y *F. oxysporum* se sometieron a un análisis de covarianza (ANCOVA). En el caso de *Bacillus* spp. contra *D. chrysanthemi* se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), de igual manera para el conteo de esporas de las confrontaciones de *Bacillus* spp. frente a *F. oxysporum* con temperatura de 27 ± 1 °C con el fin de detectar diferencias entre los tratamientos, se aplicó una comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), con el paquete estadístico SAS (versión 9.0).

Se aislaron 12 colonias de bacterias de morfología variada, de las cuales se seleccionaron dos bacterias (B4 y B5) por sus características de inhibición, las cuales presentaron características macroscópicas del género *Bacillus*, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares. Fueron Gram positiva, forma bacilar, con motilidad y la posición de la spora central, la temperatura en la que se desarrollaron fue a 45 °C con un buen crecimiento y nulo a 65 °C; mostraron buen crecimiento a un pH de 5.7, se desarrollaron en NaCl al 7%. En la prueba de metabolismo oxidativo y/o fermentativo de la glucosa no tuvieron un crecimiento aeróbico y si mostraron degradación de la glucosa, los resultados de maltosa, manitol, arabinosa, xilosa, utilización de citrato, hidrólisis almidón, hidrólisis gelatina y oxidasa dieron positivo indicando que la bacteria *Bacillus* spp. pertenece a la especie *subtilis*.

Los resultados de las dos cepas de *B. subtilis* (B4 y B5) frente a *F. oxysporum* indicaron que no hubo diferencia significativa entre los aislados y ambas disminuyeron el radio de crecimiento (RCA) de *F. oxysporum*. No obstante, en la temperatura de incubación a 25 ± 1 °C, B4 presentó 49.6% de inhibición y se extendió alrededor del hongo mostrando competencia por espacio y nutrientes. En cuanto a la escala utilizada mostró la clasificación media. Por el contrario, B5 obtuvo un porcentaje de

with motility and the position of the spore is central. The temperature at which they developed was 45 °C with an adequate growth, yet no growth was observed at 65 °C; they displayed an adequate growth rate at a pH of 5.7 and they developed in 7% NaCl. In the oxidative and/or fermentative glucose metabolism test, they displayed no aerobic growth, yet they did present glucose degradation. The tests for maltose, mannitol, arabinose, xylose, the use of citrate, starch hydrolysis, gelatin hydrolysis and oxidase were positive, indicating that the bacterium *Bacillus* spp. belongs to the species *subtilis*.

The results of both *B. subtilis* strains (B4 and B5) against *F. oxysporum* indicated no significant differences between isolations and both reduced the growth radii (RCA) of *F. oxysporum*. Nevertheless, in the incubation temperature of 25 ± 1 °C, B4 presented 49.6% inhibition and it extended around the fungus, displaying competition for space and nutrients. Regarding the scale used, it presented itself in the middle classification. On the other hand, B5 obtained a percentage of antagonism of 39.7% with a low classification (Table 1) and its growth was slow. However, *F. oxysporum* displayed a less populated mycelium and a less intense color than the control.

In the incubation at 27 ± 1 °C (Table 1), B5 proved to have an increase in the degree of inhibition with 43.0% and a middle classification, according to the scale proposed by Corrales *et al.* (2011) because the temperature had an influence on the production of metabolites, since a murky liquid was found, and with a bad odor. On the other hand, B4 reduced its degree of inhibition to 38.7% with a low classification and it produces metabolites that helped reduce the growth of the mycelia. In the latter experiment, B4 and B5 presented a reduction in the production of cottonlike mycelia in the top frontal part (Figure 1). These results were lower than those obtained by Corrales *et al.* (2011),

antagonismo de 39.7 % con una clasificación baja (Cuadro 1), su crecimiento fue lento; sin embargo, *F. oxysporum* mostró un micelio menos poblado y con una coloración de menor intensidad que en el testigo.

En la temperatura de incubación a 27 ± 1 °C (Cuadro 1), se observó que B5 mostró un incremento en el grado de inhibición con un 43.0 % y clasificación media según la escala propuesta por Corrales *et al.* (2011), esto debido a que la temperatura influyó en la producción de metabolitos, ya que se encontró un líquido con turbidez y olor. Por el contrario, B4 disminuyó su grado de inhibición a 38.7 % con una clasificación baja, produjo metabolitos que le permitieron disminuir el crecimiento del micelio. En este último experimento se observó que B4 y B5 presentaron una disminución de la producción de micelio algodonoso en la parte superior frontal (Figura 1). Dichos resultados fueron por debajo de los obtenidos por Corrales *et al.* (2011), quienes reportaron porcentajes entre el 40 y 70 %, esta variabilidad se atribuye a que cada cepa cuenta con diferente adaptabilidad y quizás la síntesis de metabolitos secundarios sea dependiente de la temperatura de incubación, de tal manera que, dependiendo de la temperatura, se produzcan algunos metabolitos con menor o mayor efecto hacia este patógeno. En

who reported percentages of 40 to 70%. This variability can be explained by each strain having a different adaptability, and perhaps the synthesis of secondary metabolites depends on the incubation temperature so that, depending on the temperature, some metabolites may be produced with a greater or lower effect on that pathogen. In such results, *Bacillus* spp. behaves differently, which may be due to what was described by Sánchez *et al.* (2015), who mentioned that there is a wide phenotypic, biochemical, serological and genetic diversity, even amongst the members of the same species.

According to the conidial concentration results, a significant difference was observed between the treatments and the control, since the control displayed an average of 12.6 spores per dilution, unlike the B5 treatments which obtained 1.3 spores, and B4, 2.6 spores, which proves that the treatments caused a reduction in the concentration of spores and the color of *F. oxysporum* was reduced and paler. The effect of the antagonism of *B. subtilis* could be due to its large production of bioactive compounds, among which cyclic lipopeptides (CLP) such as surfactin, iturin and fengycin stand out (Cochrane and Vederas, 2016). Additionally, *Bacillus* spp. produces antibiotics and enzymes (Miljaković *et al.*, 2020).

Cuadro 1. Porcentajes de antagonismo de cepas de *B. subtilis* (B4 y B5) sobre *F. oxysporum* a dos temperaturas de incubación, bajo condiciones *in vitro*.

Table 1. Percentages of antagonism of *B. subtilis* strains (B4 and B5) over *F. oxysporum* at two incubation temperatures, under *in vitro* conditions.

Aislamiento	Inhibición (%) a 26 °C	Clasificación de antagonismo ^z	Inhibición (%) a 28 °C	Clasificación de antagonismo ^z
B5	39.7 a ^y	Baja	43.0 a ^y	Media
B4	49.6 a	Media	38.7 a	Baja

^y Tratamientos con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales ($P=0.05$); F) *F. oxysporum*; B4 y B5) *B. subtilis*; ^zEscala de antagonismo según Corrales *et al.* (2011). / ^yTreatments with the same letter in the same column are statistically equal ($P=0.05$); F) *F. oxysporum*; B4 and B5) *B. subtilis*; ^zScale of antagonism according to Corrales *et al.* (2011).

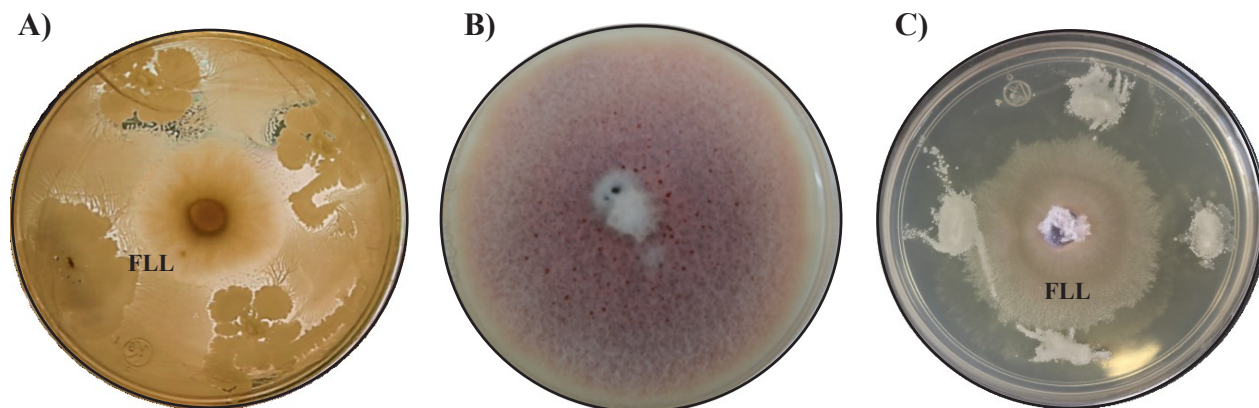


Figura 1. Efecto antagónico de cepas de *B. subtilis* (B4 y B5) frente a *F. oxysporum* (FLL); A) Aislamiento B4 a una temperatura de 25 ± 1 °C, rodea *F. oxysporum* mostrando competencia por espacio y nutrientes; B) Testigo de *F. oxysporum*; C) Aislamiento B5 a una temperatura de 27 ± 1 °C rodeando a *F. oxysporum*, mostrando producción de metabolitos.

Figure 1. Antagonistic effect of *B. subtilis* strains (B4 and B5) against *F. oxysporum* (FLL); A) Isolation B4 at a temperature of 25 ± 1 °C, it surrounds *F. oxysporum* displaying competition for space and nutrients; B) Control of *F. oxysporum*; C) Isolation B5 at a temperature of 27 ± 1 °C surrounding a *F. oxysporum*, displaying a production of metabolites.

dichos resultados *Bacillus* spp. se comportan diferente, lo cual podría deberse a lo descrito por Sánchez *et al.* (2015), quienes mencionaron que existe una amplia diversidad fenotípica, bioquímica, serológica y genética incluso entre los miembros de una misma especie.

De acuerdo a los resultados de la concentración de conidios, se observó diferencia significativa entre los tratamientos y el testigo; ya que el testigo obtuvo un promedio de 12.6 esporas por dilución, a diferencia de los tratamientos B5 obtuvo 1.3 y B4 2.6 esporas, esto prueba que los tratamientos causaron una disminución en la concentración de esporas y el color de *F. oxysporum* se vio disminuido y más tenue. El efecto del antagonismo de *B. subtilis*, podría deberse a su producción amplia de compuestos bioactivos, entre los que destacan los lipopéptidos cíclicos (CLP) como la surfactina, iturina y fengycina (Cochrane y Vederas 2016). Además, *Bacillus* spp. produce antibióticos y enzimas (Miljaković *et al.*, 2020).

In the analysis of covariance of *T. asperellum* (TJ) and *T. harzianum* (TP) against *F. oxysporum*, there were no significant differences. The confrontation with TJ displayed a growth of 6.9 cm and an inhibition of 70.5% (Table 2), although TP displayed a growth of 6.6 cm and an inhibition of 69.2% and both treatments displayed competition for space and nutrients. Furthermore, the growth radii of *F. oxysporum* decreased as the growth radii for *T. asperellum* and *T. harzianum* grew, which suggests an antagonism. Additionally, both isolations covered half of the surface of the Petri dish on day three of the evaluation, due to its rapid growth, competition for space and nutrients. Likewise, they are classified as class two where *Trichoderma* spp. grows two thirds of the surface of the medium or, in other words, this fungus covers 65% of the Petri dish (Figure 2). These results were better than those reported by Rodríguez-García and Wang-Wong (2020), who confronted native *T. asperellum* strains with *F. oxysporum* and reported

En el análisis de covarianza de *T. asperellum* (TJ) y *T. harzianum* (TP) frente a *F. oxysporum* no hubo diferencias significativas. La confrontación de TJ presentó un crecimiento de 6.9 cm y un 70.5 % de inhibición (Cuadro 2); no obstante, TP presentó un crecimiento de 6.6 cm y un 69.2 % de inhibición, ambos tratamientos mostraron competencia por espacio y nutrientes; además, se observó que los radios de crecimiento de *F. oxysporum* disminuyeron conforme el radio de crecimiento de *T. asperellum* y *T. harzianum* crecía, por lo que se considera que hay antagonismo. Además, se observó que ambos aislados cubrieron la mitad de la superficie de la caja Petri en el día tres de la evaluación, gracias a su rápido crecimiento, competencia por espacio y nutrientes. Así mismo, se clasifican como clase dos donde *Trichoderma* spp. crece dos terceras partes de la superficie del medio; es decir, que este hongo cubre el 65 % de la caja Petri (Figura 2). Estos resultados fueron mejores a los reportados por Rodríguez-García y Wang-Wong (2020), quienes confrontaron cepas nativas de *T. asperellum* frente a *F. oxysporum* y reportaron hasta un 67 % de inhibición, siendo su mejor tratamiento ya que las cepas nativas mostraron ser las más agresivas contra

Cuadro 2. Porcentajes de antagonismo de *T. asperellum* y *T. harzianum* frente a *F. oxysporum* y *D. chrysanthemi* bajo condiciones *in vitro*.

Table 2. Percentages of antagonism of *T. asperellum* and *T. harzianum* against *F. oxysporum* and *D. chrysanthemi* under *in vitro* conditions.

Tratamiento	Inhibición (%)	Clasificación de antagonismo ²
TP-F	70.5 a ¹	1
TJ-F	69.2 a	2
TP*D1	41.9 a	1
TJ*D1	40.2 a	2

¹Tratamientos con la misma letra dentro de la misma columna son estadísticamente iguales ($P=0.05$); F: *F. oxysporum*; TJ) *T. asperellum*; TP) *T. harzianum*; D1) *D. chrysanthemi*. ²Escala de antagonismo según Bell *et al.* (1982). / ¹Treatments with the same letter in the same column are statistically equal ($P=0.05$); F: *F. oxysporum*; TJ) *T. asperellum*; TP) *T. harzianum*; D1) *D. chrysanthemi*. ²Scale of antagonism according to Bell *et al.* (1982).

a level of inhibition of up to 67%, which was their best treatment, since native strains proved to be the most aggressive against the phytopathogen. The results may be due to what was reported by Andrade-Hoyos *et al.* (2019), who mentioned that *Trichoderma* sp. has the ability of performing

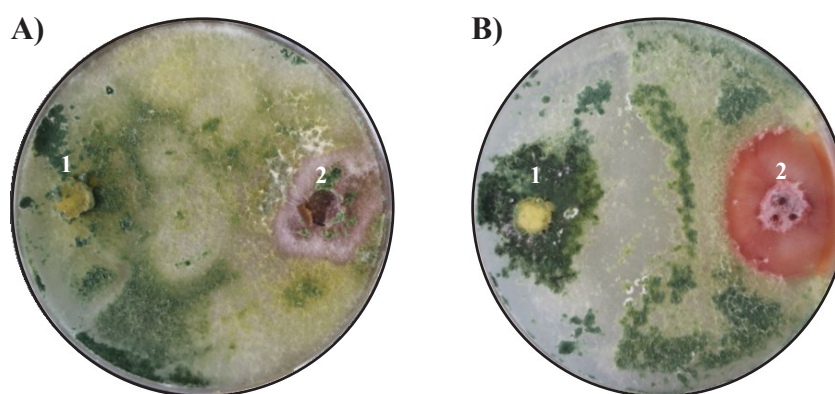


Figura 2. A) *Trichoderma harzianum* (1) rodeando a *F. oxysporum* (2) manifestando competencia por espacio y nutrientes en medio PDA; (B) *T. asperellum* (1) rodeando a *F. oxysporum* (2) mostrando competencia por espacio.

Figure 2. A) *Trichoderma harzianum* (1) surrounding *F. oxysporum* (2) expressing competition for space and nutrients in a PDA medium; (B) *T. asperellum* (1) surrounding *F. oxysporum* (2) expressing competition for space.

el fitopatógeno. Los resultados podrían deberse a lo reportado por Andrade-Hoyos *et al.* (2019), quienes mencionaron que *Trichoderma* sp., cuenta con la facultad de ejercer micoparasitismo. Lo cual podría deberse a la producción de enzimas líticas, proteasas y la capacidad de producir una lisis en las hifas del hongo fitopatógeno penetrándolo, alimentándose de él, ya que las lecitinas que produce van degradando su pared celular. Además, produce quitinasa y las actividades -1, 3-glucanasa (Li *et al.*, 2018), degradando la pared celular fúngica, lo que limita el crecimiento del patógeno (Coban, 2020). Los mecanismos de biocontrol antes mencionados, le permitieron al antagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos (García-Espejo *et al.*, 2016). *Trichoderma* sp., puede controlar una amplia gama de hongos fitopatógenos como: *R. solani*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* (Martínez-Martínez *et al.*, 2020).

En el análisis de varianza de la evaluación de *B. subtilis* frente a *D. chrysanthemi* no se encontraron diferencias significativas. Se observó que B4 obtuvo un halo de 4.4 mm de ancho y B5 4.3 mm, causado por los metabolitos que produce la bacteria para inhibir *D. chrysanthemi*, mostrando antagonismo. Además, *B. subtilis* comenzó a colonizar y expandirse mostrando competencia por espacio y nutrientes sobrecreciendo a *D. chrysanthemi* (Figura 3). Resultados contrarios a los de Sneha y Anuradha (2017), evaluaron *B. subtilis* frente *Pectobacterium carotovorum*, y no encontraron la formación de halos de inhibición. Sin embargo, los resultados obtenidos en este experimento quedaron muy por debajo de los resultados reportado por Gerayeli *et al.* (2018), al evaluar *Bacillus* spp. frente a *P. carotovorum* reportaron halos de 10 mm. En dichos resultados *Bacillus* spp. se comporta diferente, este podría deberse a lo descrito por Sánchez *et al.* (2015) quienes mencionaron que en los miembros

mycoparasitism, which, in turn, may be due to the production of lytic enzymes, proteases and the ability to produce lysis in the hyphae of the phytopathogenic fungus, penetrating it and feeding off it, since the lethicins it produces degrade its cell wall. It also produces chitinase and the -1, 3-glucanase activities (Li *et al.*, 2018), degrading the fungal cell wall, which limits the growth of the pathogen (Coban, 2020). The previously mentioned biocontrol mechanisms helped the antagonist make better use of the nutrients in the medium and deprive the pathogen from using these resources (García-Espejo *et al.*, 2016). *Trichoderma* sp. can control a wide range of phytopathogenic fungi such as *R. solani*, *F. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* (Martínez-Martínez *et al.*, 2020).

In the analysis of variance of the evaluation of *B. subtilis* against *D. chrysanthemi* no significant differences were found. B4 was found to have developed a halo around it with a width of 4.4 mm in width, and B5, a 4.3 mm wide halo, both caused by the metabolites produced by the bacteria to inhibit *D. chrysanthemi*, displaying antagonism. In addition, *B. subtilis* began colonizing and expanding, in a display of competition for space and nutrients, overgrowing *D. chrysanthemi* (Figure 3). These results are opposite to those by Sneha and Anuradha (2017), who evaluated *B. subtilis* against *Pectobacterium carotovorum*, and found no inhibition halos. However, the results obtained in this experiment were quite lower than those reported by Gerayeli *et al.* (2018). In their evaluation of *Bacillus* spp. against *P. carotovorum*, they reported halos of 10 mm in width. In those results, *Bacillus* spp. behaves differently, probably due to a report by Sánchez *et al.* (2015), who mentioned that in the members of a same species there may be a wide phenotypic, biochemical, serological and genetic diversity. On the other hand, Sneha and Anuradha (2017) proved that *Bacillus*

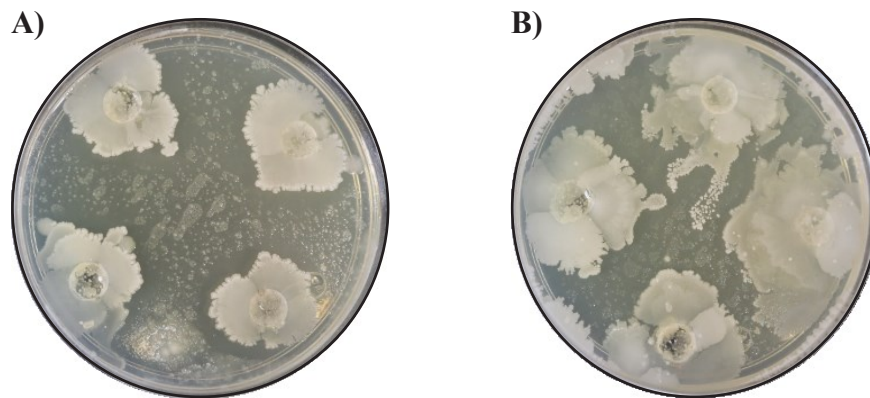


Figura 3. A) Halo de inhibición del crecimiento de *D. chrysanthemi* por efecto del aislamiento B4; B) Aislamiento B4 sobrecrece a la bacteria *D. chrysanthemi* mostrando competencia por espacio y nutrientes.

Figure 3. A) Halo of inhibition from the growth of *D. chrysanthemi* as an effect of isolation B4; B) Isolation B4 overgrows bacteria *D. chrysanthemi*, expressing competition for space and nutrients.

de una misma especie puede existir una amplia diversidad fenotípica, bioquímica, serológica y genética. Por otra parte, Sneha y Anuradha (2017) demostraron que *Bacillus* spp. tienen efecto antagónico frente a las bacterias pectolíticas como *P. carotovorum*.

En cuanto al análisis de covarianza de *Trichoderma* spp. frente a *D. chrysanthemi* se observó que no hay diferencia significativa entre tratamientos. El TJ mostró un porcentaje del 41.9 % y TP un 40.2 % y ambos rodearon *D. chrysanthemi*, los cuales presentaron competencia por espacio y nutrientes. Inicialmente, la bacteria era de apariencia cremosa, pero con el paso del tiempo se tornó con apariencia seca, su crecimiento se detuvo e incluso se observó un ligero crecimiento de micelio hasta el día de la evaluación. De acuerdo con la escala de Corrales *et al.* (2011), ambos tratamientos cuentan con una clasificación de antagonismo media. Dichos resultados fueron superiores a los reportados por Astorga-Quirós *et al.* (2014), quienes obtuvieron un 32.3 % de antagonismo al evaluar *Trichoderma* spp. frente a *Pseudomonas marginalis*, bacteria pectolítica que causan podredumbres blandas.

spp. has an antagonistic effect on pectolytic bacteria such as *P. carotovorum*.

Regarding the analysis of covariance performed on *Trichoderma* spp. against *D. chrysanthemi*, no significant differences were observed between treatments. TJ displayed a percentage of 41.9 and TP, 40.2% and both surrounded *D. chrysanthemi*, which showed signs of competition for space and nutrients. Initially, the bacterium has a creamy appearance, yet with time its appearance became dry, its growth stopped and there was even a slight growth of mycelia until the day of the evaluation. According to the scale by Corrales *et al.* (2011), both treatments have a middle antagonism classification. These results were higher than those reported by Astorga-Quirós *et al.* (2014), who obtained a 32.3% antagonism when evaluating *Trichoderma* spp. against *Pseudomonas marginalis*, a pectolytic bacterium that causes soft rot.

The native *T. asperellum* and *T. harzianum* strains resulted antagonistic, with inhibitions of 39.7 to 49.6% against *F. oxysporum*, and in the confrontation with *D. chrysanthemi*, inhibition rates of 40.2 to 41.9% were found. *B. subtilis*

Las cepas nativas de *T. asperellum* y *T. harzianum*, resultaron antagonistas con inhibición de 39.7 a 49.6 % contra *F. oxysporum* y en la confrontación con *D. chrysanthemi* se obtuvo porcentajes de inhibición de 40.2 a 41.9 %. Para el caso de *B. subtilis* alcanzó un nivel medio de antagonismo frente a *F. oxysporum* a pesar de ser una bacteria confrontada frente a un hongo, y obtuvo un halo de inhibición de 4.4 mm frente a *D. chrysanthemi*.

LITERATURA CITADA

- Álvarez MG, Rodríguez RG y Flores AM. 2012. Efectos de la certificación sobre la competitividad de la industria de la sábila en México. *Revista Mexicana de Agronegocios* 30: 921-929. <https://www.redalyc.org/pdf/141/14123097013.pdf>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Osorio-Hernández E, Molina-Gayosso E, Landero-Valenzuela N y Barrales-Cureño HJ. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga VC, Brenes-Madriz J y Rivera-Méndez W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha* 27: 82-91. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- Ávila NDD, Velasco CR, Luna GE, Campos OJC, Cambero ACB and Estrada-Virgen MO. 2020. Identification and antagonistic activity *in vitro* isolation of bacteria against fungi of agricultural important. *Revista Bio Ciencias* 7: e803. <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e803>
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Ecology and Epidemiology* 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Calvo P y Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9(1): 31-39. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
- Castro AE, Hernández CFD, Gallegos MG, Ochoa FYM and Castillo RF. 2019. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* with endophytic bacteria formulation and its effect in the growth promotion in bean crop. *Revista Bio Ciencias* 6: 1-13. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e416>
- Corrales LC, Sánchez LC, Cuervo J, Bautista D, González L y Guevara M. 2011. Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium* spp. bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 8(13): 63-75. <https://doi.org/10.22490/24629448.440>
- reached a middle level of antagonism against *F. oxysporum*, despite being bacteria confronted against a fungus, and it produced an inhibition halo of 4.4 mm against *D. chrysanthemi*.
- ~~~~~ End of the English version ~~~~~
- Coban HB. 2020. Organic acids as antimicrobial food agents: Applications and microbial productions. *Bioprocess Biosyst* 43(4): 569-591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>
- Cochrane SA and Vederas JC. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* 36(1): 4-31. <https://doi.org/10.1002/med.21321>
- Fiorentino N, Rosa AD, Gioia L, Senatore MD, Visconti L, Ottaiano V, Cenvinzo E, Cozzolino Y, Roupheal S, Woo MM and Fagnano M. 2016. Effects of *Trichoderma* on growth and nitrogen uptake of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *XLV Convegno della Società Italiana di Agronomia* 134-135. https://www.researchgate.net/publication/309174868_Effects_of_Trichoderma_on_Growth_and_Nitrogen_Uptake_of_Lettuce_Lactuca_sativa_L
- García-Espejo C, Mamani-Mamani N, Mercedes M, Chávez-Lizárraga GA and Álvarez-Aliaga MT. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1): 20-32. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942016000100004
- Gerayeli N, Baghaee-Ravari S and Tarighi S. 2018. Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Phytopathology* 150(4): 1049-1063. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1344-0>
- Jiménez CHE. 2015. Identificación de fitopatógenos asociados a las principales enfermedades del cultivo de sábila en los municipios de agua de Dios y Ricaurte (Cundinamarca). *Revista Tecnología y Productividad Girardot, Regional Cundinamarca* 1(1): 35-50. <http://revistas.sena.edu.co/index.php/rtyp/article/view/244/269>
- Li YT, Hwang SG, Huang YM and Huang CH. 2018. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and *Fusarium* wilt of tomato. *Crop Protection* 110: 275-282. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.021>
- Mannai S, Horrigue-Raouani N and Boughalleb-MHamdi N. 2018. Effect of six fungicides against *Fusarium oxysporum* and *F. solani* associated with peach seedlings decline in Tunisian nurseries. *Annual Research & Review in Biology* 26(4): 1-11 <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/41295>
- Martínez-Martínez TO, Guerrero-Aguilar BZ, Pecina-Quintero B, Rivas-Valencia P, González-Pérez E y Angeles-Núñez JG. 2020. Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante.

- Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 11(5): 1135-1147. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2325>
- Miljaković D, Marinković J and Balešević-Tubić S. 2020. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms* 8(7): 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia JA y Fernández-Pavía SP. 2021. Actividad antifúngica de *Trichoderma harzianum* y *T. koningiopsis* contra *Fusarium solani* asociado en la germinación y vigor de plántulas de chile Miahuateco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(2): 228-247. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>
- Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P and Hens L. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health* 148: 1-8 <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Pappas ML, Baptista P, Broufas DG, Dalakouras A, Djjobi W, Flors V, Msaad GM, Khayi S, Mentag R, Pastor V, Pereira JA, Sánchez-Bel P and Papadopoulou K. 2020. Biological and molecular control tools in plant defense. In: Mérillon JM and Ramawat KG (eds) *Plant Defense: Biological Control*. *Progress in biological control* 22: 3-43. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51034-3_1
- Reinoso PY, Casadesús LR, García AS, Gutiérrez P y Álvarez-Rivera VP. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad* 10(3): 187-191. <http://www.redalyc.org/pdf/2091/209116108001.pdf>
- Ribeiro MS, Graciano de PR, Voltan AR, de Castro RG, Carraro CB, de Assis LJ, Stecca SA, Goldman GH, Silva RN, Ulhoa CJ and Monteiro VN. 2019. Endo- β -1,3-glucanase (GH16 Family) from *Trichoderma harzianum* Participates in Cell Wall Biogenesis but Is Not Essential for Antagonism Against Plant Pathogens. *Biomolecules* 9(12): 781. <https://doi.org/10.3390/biom9120781>
- Rodríguez-García D y Wang-Wong A. 2020. Efectividad a nivel *in vitro* de *Trichoderma* spp. nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense* 44(2): 2 <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>
- Rubio TS, Pérez SCA y Osorio HE. 2020. Sábila (*Aloe vera*): propiedades, usos y problemas. *Ciencia UANL* 23(99): 1-6. <http://cienciauanl.uanl.mx/?p=9681>
- Sánchez AD, Barrera V, Reybet GE and Sosa MC. 2015. Biocontrol with *Trichoderma* spp. of *Fusarium oxysporum* causal of "seedling disease" in pre and post emergence in onion. *Magazine of the Faculty of Agronomy La Plata* 114(1): 61-70 <http://revista.agro.unlp.edu.ar/index.php/revagro/article/view/396/178>
- Sánchez-León GL and Bustos A. 2020. Potencial antagonico de cepas de *Trichoderma* spp. contra patógenos foliares de árboles en parques de los Cerros Orientales de Bogotá. *Revista Facultad De Ciencias Básicas* 15(2): 107-115. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3899>
- Schaad NW, Jonas JB and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third Edition. Ed APS PRESS Minnesota U.S.A. 373 p. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00635.x>
- Sneha SG and Anuradha SN. 2017. Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 9: 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.11.004>
- Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG, Núñez-Pastrana R, Quezada-Salinas A and Márquez-Liconaet G. 2021. Biocontrol del ahogamiento de plántulas de calabacita con *Bacillus subtilis* QST 713. *Revista Mexicana de Fitopatología* 39(2): 302-313. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-2>