



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RIZOBACTERIAS
CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA CONTRA *Sclerotium rolfsii*
Sacc. Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS**

Por:

Rosalía López Corrales

TESIS APROBADA POR LA

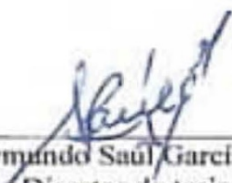
COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

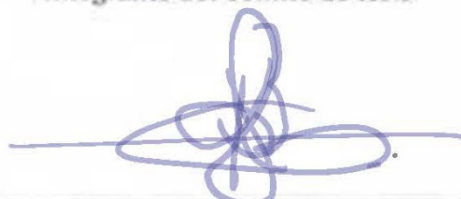
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rosalía López Corrales la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



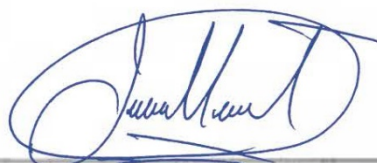
Dr. Raymundo Saul García Estrada
Director de tesis



Dra. Josefina León Félix
Integrante del comité de tesis



Dr. José Benigno Valdez Torres
Integrante del comité de tesis



Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Aislamiento y Caracterización de Rizobacterias con Actividad Antagonista Contra *Sclerotium rolfsii* Sacc. y Promoción de Crecimiento en Plantas” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Rosalía López Corrales, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD), Coordinación Culiacán, por abrirme sus puertas desde mis inicios en la investigación como estudiante de licenciatura, lo que motivó mi interés por seguir el camino de la investigación. Posteriormente, aceptarme como miembro del programa de Maestría en Ciencias y permitirme formar parte de la comunidad estudiantil.

A mi director de tesis, Dr. Raymundo Saúl García Estrada, por sus consejos y atinada orientación durante el desarrollo de este proyecto, así como brindarme todos los recursos y medios necesarios para la realización de esta investigación, a quien debo parte importante de ver concluida esta meta profesional.

A los miembros del comité de tesis, quienes a través de cada reunión y revisión hicieron posible la maduración y culminación de este trabajo. A la Dra. Josefina León Félix, por sus comentarios siempre acertados en pro de mejorar el rumbo de la investigación; al Dr. José Benigno Valdez Torres, que sin su ayuda no hubiera sido posible sentar las bases de los experimentos llevados a cabo en este trabajo; y finalmente pero no menos importante, al Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, por los conocimientos adquiridos, que serán útiles para el resto de mi desarrollo profesional.

Al equipo técnico que conforma el Laboratorio de Fitopatología: M.C. Isidro Márquez Zequera, Ing. Luis Alfredo Osuna García y Dra. Isabel Cruz Lachica; por su amabilidad, su atención y por todos los conocimientos y el apoyo que recibí de su parte. A los compañeros que también pertenecen al área de Fitopatología: M.C. Ana María López López, M.C. Carlos Iván Cota Barreras, M.C. Nancy Ley López; por sus enseñanzas y sus consejos, tanto en el ámbito laboral como personal, quienes además de colegas se convirtieron en amigos.

A los muchachos de programa de inicio a la investigación con los que tuve la oportunidad de convivir: Arely, Nahomi, Armando y Alfonso. Espero haber sido una influencia para ustedes, como lo fueron para mí, porque el ser humano nunca deja de aprender.

A mis profesores, por el conocimiento que me aportaron y que sin duda valoro.

A mis compañeros de generación de maestría: Edén, Rigoberto, Alicia, Estefanía, Ángel, Manuel, Yazmin, Lennin, Alsino, Iliana, Luis, Ricardo, Dulce, Alejandra, Grecia; por su compañía en este

proceso y por los lazos de amistad cultivados.

A mi novio, quien además de ser mi compañero en este proceso fue mi amigo, mi ayudante, mi apoyo y mi confidente.

A mi hermano, mi primer amigo y compañero de vida.

A mis padres, por estar siempre para mí; por escucharme, apoyarme, aconsejarme e incluso regañarme, todo pensando en mi bienestar. Por las enseñanzas y valores que me inculcaron y me convierten en la persona que soy, quienes son merecedores de este logro tanto o más que yo.

DEDICATORIA

*Las madres valoran nuestra existencia más que nuestros logros, por eso
merecen todo.*

Para mi mamá, hasta el cielo.

*Mamá, tú eres y siempre serás lo mejor de mí, gracias por haberme
hecho la persona que soy.*

Jesús Armida Corrales Torres †

11/06/20

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS.....	10
LISTA DE FÓRMULAS.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento de las Plantas.....	15
2.1.1. Mecanismos de Promoción de Crecimiento	16
2.1.1.1. Mecanismos Directos	16
2.1.1.2. Mecanismos Indirectos	18
2.1.2. Uso Potencial de Rizobacterias en la Agricultura	19
2.2. Generalidades de <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.....	20
2.2.1. Taxonomía de <i>Sclerotium rolfsii</i>	21
2.2.2. Características Morfológicas y Fisiológicas de <i>Sclerotium rolfsii</i>	21
2.2.3. Síntomas Causados por <i>Sclerotium rolfsii</i>	22
2.2.4. Métodos de Control de <i>Sclerotium rolfsii</i>	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo General.....	25
4.2. Objetivos Específicos	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Muestreo de Suelos.....	26
5.2. Aislamiento y Purificación de Bacterias a Partir de Muestras de Suelo	26
5.3. Evaluación <i>in vitro</i> de Actividad Antagonista Contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	27
5.3.1. Material Biológico	27
5.3.2. Técnica de Cultivo Dual	27
5.3.3. Diseño Experimental.....	28
5.4. Caracterización de Aislados Bacterianos con la Mejor Capacidad Antagonista <i>in vitro</i> Contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	29
5.4.1. Caracterización Morfológica	29
5.4.2. Tinción de Gram	30
5.4.3. Tinción de Endosporas.....	30

CONTENIDO (continuación)

5.4.4. Extracción de ADN, Amplificación por PCR y Secuenciación.....	31
5.5. Evaluación <i>in vivo</i> de Actividad Antagonista Contra <i>Sclerotium rolfsii</i> y Promoción de Crecimiento de Plantas	32
5.5.1. Material Biológico	32
5.5.2. Inoculación.....	33
5.5.3- Diseño Experimental	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1. Muestreo de Suelos.....	38
6.2. Aislamiento y Purificación de Bacterias a Partir de Muestras de Suelo	38
6.3. Evaluación <i>in vitro</i> de Actividad Antagonista Contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	39
6.4. Caracterización de Aislados Bacterianos con la Mejor Capacidad Antagonista <i>in vitro</i> Contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	42
6.4.1. Caracterización Morfológica	42
6.4.2. Identificación Molecular de las Bacterias.....	43
6.5. Evaluación <i>in vivo</i> de Actividad Antagonista Contra <i>Sclerotium rolfsii</i> y Promoción de Crecimiento de Plantas	44
6.5.1. Evaluación <i>in vivo</i> de Actividad Antagonista Contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	44
6.5.2. Evaluación <i>in vivo</i> de Promoción de Crecimiento de Plantas	49
7. CONCLUSIONES	63
8. RECOMENDACIONES	64
9. REFERENCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Tasa de inhibición de crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfii</i> por parte de los aislados bacterianos..	40
2. Inhibición de crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfii</i> por parte de los aislados bacterianos.	41
3. Morfología de las colonias de los aislados seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones <i>in vitro</i>	42
4. Tinción Gram positiva y forma bacilar de los aislados seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones <i>in vitro</i>	43
5. Tinción de esporas de los aislados seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones <i>in vitro</i>	43
6. Amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores FD2 y RP1 para ADN bacteriano de los aislados bacterianos.....	44
7. Efectividad biológica de las cepas bacterianas evaluadas contra <i>Sclerotium rolfii</i>	46
8. Efecto de biocontrol de las cepas bacterianas sobre <i>S. rolfii</i> cinco semanas después de la inoculación.	47
9. Severidad de la enfermedad mostrada en plantas inoculadas con las cepas bacterianas evaluadas contra <i>Sclerotium rolfii</i>	48
10. Gráficos de efectos principales e interacciones para el incremento en la altura de planta.	55
11. Gráficos de efectos principales e interacciones para el incremento e grosor del tallo.	56
12. Gráficos de efectos principales e interacciones para el peso seco.....	58
13. Crecimiento de plantas promovido por las cepas bacterianas cinco semanas después de la inoculación.	59

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Tratamientos para la evaluación <i>in vitro</i> de actividad antagonista de aislados bacterianos contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	29
2. Condiciones de la amplificación por PCR, para los iniciadores FD2 y RP1 que codifican para el ARNr 16S.	31
3. Escala de severidad de la enfermedad causada por <i>Sclerotium rolfsii</i>	33
4. Tratamientos para la evaluación <i>in vivo</i> de actividad antagonista de las cepas bacterianas seleccionadas contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	35
5. Tratamientos para la evaluación del crecimiento de plantas promovido por las cepas bacterianas seleccionadas, para las variables respuesta incremento en altura de planta e incremento en grosor de tallo.	36
6. Tratamientos para la evaluación del crecimiento de plantas promovido por las cepas bacterianas seleccionadas, para la variable respuesta peso seco.	37
7. Localización geográfica de los sitios considerados para el muestreo de suelos.	38
8. Descripción de la morfología colonial de los aislados bacterianos obtenidos de muestras de suelos.	39
9. Análisis de Varianza (ANOVA) para la tasa de inhibición (%) de crecimiento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> por parte de los aislados bacterianos, después de cuatro días de crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo.	40
10. Identidad de los aislados bacterianos seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones <i>in vitro</i> contra <i>Sclerotium rolfsii</i>	44
11. Análisis de Varianza (ANOVA) para la efectividad biológica (%) sobre <i>Sclerotium rolfsii</i> por parte de las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.	45
12. Análisis de Varianza (ANOVA) para el incremento en la altura de las plantas (cm) promovido por las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.	49
13. Requerimientos nutricionales de los principales macronutrientes para tomate y chile.	51
14. Análisis de Varianza (ANOVA) para el incremento en el grosor del tallo (mm) promovido por las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.	52
15. Análisis de Varianza (ANOVA) para el peso seco (g) de planta promovido por las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.	57

LISTA DE FÓRMULAS

Fórmula	Página
1. Tasa de inhibición.....	28
2. Porcentaje de severidad del daño.....	33
3. Efectividad biológica	34

RESUMEN

El estado de Sinaloa es el primer productor nacional de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.). La producción de estos cultivos se ve afectada principalmente por la presencia de enfermedades producidas por hongos, sobresaliendo la especie *Sclerotium rolfsii*. Actualmente, el control de este hongo en la región se efectúa mediante técnicas culturales y la aplicación de productos químicos, los cuales han mostrado ser poco eficaces. Por ello, la búsqueda de alternativas de control biológico es una opción prometedora. El objetivo del presente trabajo fue identificar y evaluar rizobacterias con capacidad antagonista contra *Sclerotium rolfsii* y promoción del crecimiento en tomate, chile y berenjena. Un total de 16 aislados bacterianos obtenidos de muestras de suelo de los estados de Sinaloa y Nayarit, se evaluaron mediante la técnica de cultivo dual para determinar su actividad antagónica *in vitro* contra *S. rolfsii*. Los aislados que presentaron una tasa de inhibición superior al 50% [N6-2 (69.18%), S3-3 (60.22%), S1-3 (59.33%), N7-1 (56.53%) y L-2 (55%)], se seleccionaron para la evaluación de su actividad antagónica *in vivo* contra el hongo fitopatógeno y la promoción de crecimiento en plantas de tomate, chile y berenjena. La caracterización por medio de técnicas morfológicas y moleculares de los aislados seleccionados mostró un porcentaje de identidad de 96.51% con *Bacillus pseudomycooides* para el aislado N6-2, 100% con *B. cereus* para S1-3 y S3-3, 99.76 y 99.53% con *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* para N7-1 y L-2, respectivamente. Plántulas de tomate, berenjena y chile se inocularon con suspensiones bacterianas de los aislados seleccionados y suspensión micelial del hongo fitopatógeno. Se calculó la efectividad biológica y se registró la altura de las plantas, el grosor de su tallo y el peso seco. Todos los aislados evaluados presentaron mayor efectividad biológica (91-100%) comparados con el testigo inoculado. Destacando *B. pseudomycooides*, quien presentó la mejor promoción de crecimiento en planta en los cultivos evaluados. En conclusión, la presente investigación comprobó la actividad antagónica de las cepas bacterianas de *B. pseudomycooides*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* contra *Sclerotium rolfsii*, así como su capacidad para promover el crecimiento de plantas de tomate, berenjena y chile.

Palabras clave: Antagonismo, control biológico, promoción de crecimiento, rizobacterias, *Sclerotium rolfsii*.

ABSTRACT

The state of Sinaloa is the first national producer of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), eggplant (*Solanum melongena* L.) and chili (*Capsicum annuum* L.). The production of these crops is affected mainly by the presence of fungal diseases, among which *Sclerotium rolfsii* stands out. Currently, the control of this fungus in the region is carried out through cultural techniques and the application of chemical products, which have proven to be ineffective. Therefore, the search for biological control alternatives is a promising option. The aim of this study was to identify and evaluate rhizobacteria with antagonistic capacity against *Sclerotium rolfsii* and growth promotion in tomato, chili and eggplant. A total of 16 bacterial isolates obtained from soil samples from the states of Sinaloa and Nayarit were evaluated using the dual culture technique to determine their *in vitro* antagonistic activity against *S. rolfsii*. The isolates that presented an inhibition rate greater than 50% [N6-2 (69.18%), S3-3 (60.22%), S1-3 (59.33%), N7-1 (56.53%) and L-2 (55 %)], were selected for the evaluation of their antagonistic activity *in vivo* against the phytopathogenic fungus and the growth promotion in tomato, chili and eggplant plants. Morphological and molecular characterization of the selected isolates showed a percentage of identity of 96.51% with *Bacillus pseudomycoides* for isolate N6-2, 100% with *B. cereus* for S1-3 and S3-3, 99.76 and 99.53% with *B. amyloliquefaciens* and *B. velezensis* for N7-1 and L-2, respectively. Tomato, eggplant and chili seedlings were inoculated with bacterial suspensions of the selected isolates and mycelial suspension of the phytopathogenic fungus. The biological effectiveness was calculated, also the height of the plants, the thickness of their stem and the dry weight were registered. All the evaluated isolates presented greater biological effectiveness (91-100%) compared to the inoculated control. Highlighting *B. pseudomycoides*, who presented the best plant growth promotion in the evaluated crops. In conclusion, the present study verified the antagonistic activity of bacterial strains of *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. velezensis* against *Sclerotium rolfsii*, as well as their ability to promote the growth of tomato, eggplant and chili plants.

Key words: Antagonism, biological control, growth promotion, rhizobacteria, *Sclerotium rolfsii*.

1. INTRODUCCIÓN

El estado de Sinaloa es el primer productor nacional de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.), con una producción de 1,088,251, 858,543 y 169,815 ton, respectivamente (SIAP, 2019). Sin embargo, la producción de estos cultivos se ve afectada principalmente por la presencia de enfermedades producidas por hongos.

Dentro de la diversidad de organismos causantes de enfermedades sobresale *Sclerotium rolfsii*, hongo fitopatógeno asociado con enfermedades en más de 500 especies vegetales, pertenecientes a más de 100 diferentes familias de plantas (Mahadevakumar et al., 2016; Paul et al., 2017). A este patógeno se le atribuyen pérdidas de rendimiento de 30 a 90% en cultivos de tipo solanáceas (Pérez-Acevedo et al., 2017). Entre los síntomas que ocasiona se encuentran: marchitez, pudrición del fruto, pudrición del tallo y tizón de la hoja, además es común encontrar la presencia de esclerocios (estructuras de resistencia) en la parte externa de los tejidos vegetales infectados (Agrios, 2005).

Actualmente, el control de este hongo se efectúa mediante la implementación de técnicas culturales, así como la aplicación de productos químicos (Metil-Benzimidazol-Carbamatos), con resultados poco satisfactorios (Agrios, 2005; Dwivedi y Prasad, 2016). Por otro lado, la toma de conciencia sobre el cuidado del ambiente, aunado al incremento de plagas, resultado de la generación de resistencia a los plaguicidas y la degradación del suelo, debido al uso intensivo de agroquímicos, han llevado a la búsqueda de alternativas sustentables (He et al., 2016).

Una alternativa viable es el uso de rizobacterias antagonistas, las cuales promueven el crecimiento de las plantas, mediante la solubilización y absorción de nutrientes; o bien, previniendo o neutralizando los efectos nocivos de los fitopatógenos en las plantas al producir sustancias que aumentan la resistencia natural del hospedante, mecanismo conocido generalmente como control biológico (Bhattacharyya y Jha, 2012; Gouda et al., 2018; Mustafa et al., 2019).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y evaluar rizobacterias con capacidad antagonista contra *Sclerotium rolfsii* y promoción del crecimiento en planta.

2. ANTECEDENTES

2.1. Rizobacterias Promotoras de Crecimiento de las Plantas

El término “rizobacterias” fue introducido por Kloepper y Schroth (1978) para referirse a la comunidad de bacterias del suelo que colonizan de forma competitiva las raíces de las plantas y estimulan el crecimiento, reduciendo así la incidencia de enfermedades de las plantas. Posteriormente en 1981, denominaron a estas rizobacterias benéficas como “rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas” (PGPR, por sus siglas en inglés).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas, incluyen bacterias de vida libre o aquellas que establecen relaciones simbióticas con plantas en la rizosfera o mediante colonización endofítica (Roriz et al., 2020) y que influyen en el crecimiento y la supervivencia de las plantas a través de la producción de diversos compuestos químicos. De acuerdo con su grado de asociación con las células de la raíz de la planta, las PGPR pueden clasificarse en rizobacterias extracelulares promotoras del crecimiento (ePGPR) y rizobacterias intracelulares promotoras del crecimiento (iPGPR). Los ePGPR pueden existir en la rizósfera, en el rizoplaneo o en los espacios entre las células de la corteza de la raíz; por otro lado, los iPGPR se ubican generalmente dentro de las estructuras nodulares especializadas de las células de la raíz (Bhattacharyya y Jha, 2012).

La rizósfera está compuesta por tres diferentes componentes: la rizósfera (suelo), el rizoplaneo y la raíz misma. Entre ellos, la rizósfera es la zona del suelo regulada por las raíces a través de la liberación de exudados y que afecta la actividad microbiana. El rizoplaneo es la superficie de la raíz que se une fuertemente a las partículas del suelo, y la raíz que está colonizada por microorganismos. Para mantener sus efectos benéficos en el entorno de la raíz, las bacterias deben competir con otros microorganismos de la rizósfera por los nutrientes secretados por la raíz. Las interacciones entre la planta y la rizósfera son esenciales para obtener agua y nutrientes del suelo y las interacciones son benéficas para las plantas y los microorganismos transmitidos por el suelo (Gouda et al., 2018).

2.1.1. Mecanismos de Promoción de Crecimiento

Las investigaciones sobre los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas mediante PGPR indican que las cepas efectivas aumentaron el crecimiento de las plantas básicamente al cambiar toda la estructura de la comunidad microbiana en la rizósfera (Kloepper y Schroth, 1981). Razón por la que pueden promover el crecimiento y el desarrollo de las plantas de manera directa e indirecta.

2.1.1.1. Mecanismos Directos. Las rizobacterias promotoras del crecimiento pueden facilitar directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de mecanismos tales como reemplazo de los nutrientes del suelo, aumento de la disponibilidad de nutrientes y/o mejoramiento del acceso de las plantas a los nutrientes (Roriz et al., 2020). Estos mecanismos afectan la actividad de crecimiento de la planta directamente y su efectividad varía según la cepa microbiana y la especie vegetal. El enriquecimiento directo de la absorción de minerales se produce debido al aumento en los flujos de iones individuales en la superficie de la raíz cuando existe la presencia de PGPR (Gouda et al., 2018).

Fijación de nitrógeno. El crecimiento y desarrollo de las plantas depende del suministro de nitrógeno. Aunque la atmósfera es muy nitrogenada (casi el 78%), este N_2 atmosférico no es utilizable para las plantas. Esta situación llevó al desarrollo de un proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (BNF, por sus siglas en inglés) por parte de la microflora fijadora de nitrógeno, principalmente rizobacterias (Mustafa et al., 2019). La fijación de N_2 se realiza mediante la expresión de un gen particular llamado *nif*, que junto con otros genes estructurales participa en la activación de la proteína de hierro, la donación de electrones, la biosíntesis del co-factor de molibdeno de hierro y muchos otros genes reguladores para la síntesis y la actividad de la enzima (Gouda et al., 2018).

Solubilización de fosfato. El fósforo es uno de los nutrientes más esenciales en las plantas. Irónicamente, aun cuando los suelos tienen un gran depósito de fósforo (P) total, la cantidad disponible para las plantas suele ser muy pequeña, esto debido a que la gran mayoría del fósforo en el suelo se encuentra en forma insoluble, mientras que las plantas solo pueden absorberlo en dos

formas solubles, los iones monobásico (H_2PO_4^-) y dibásico (HPO_4^{2-}) (Bhattacharyya y Jha, 2012). Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular sintetizados por diversas bacterias del suelo solubilizan el fósforo inorgánico, por lo que la solubilización y mineralización del fósforo por parte de bacterias solubilizadoras de fosfato es un rasgo importante que puede lograrse mediante PGPR (Gouda et al., 2018).

Solubilización de potasio. El potasio es el tercer macronutriente esencial más importante para el crecimiento de las plantas. Como más del 90% del potasio existe en forma de roca insoluble y minerales de silicato, la concentración de potasio soluble generalmente es muy baja en el suelo, la capacidad de las PGPR para solubilizar la roca de potasio produciendo y secretando ácidos orgánicos se ha investigado ampliamente (Gouda et al., 2018).

Producción de sideróforos. Los sideróforos son pequeñas moléculas orgánicas producidas por microorganismos en condiciones limitantes de hierro que mejoran la capacidad de absorción de este elemento. Al respecto, las rizobacterias promotoras del crecimiento tienen la capacidad de producir sideróforos, los cuales son un activo importante que proporciona a la planta la cantidad necesaria de hierro (Gouda et al., 2018).

Conservación de la fertilidad del suelo. Se conoce que las rizobacterias tienen la habilidad de incrementar la absorción de nutrientes como Ca, K, Fe, Cu, Mn y Zn por las plantas a través de la estimulación de la bomba de protones ATPasa. Este aumento en la absorción de nutrientes por parte de las plantas podría explicarse a través de la producción de ácidos orgánicos por parte de las plantas y las PGPR, disminuyendo el pH del suelo en la rizósfera (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Producción de fitohormonas. Las fitohormonas o reguladores del crecimiento de las plantas son sustancias orgánicas que, a bajas concentraciones (<1 mM), promueven, inhiben o modifican el crecimiento y el desarrollo de las plantas. La producción de estas fitohormonas también puede ser inducida por ciertos microorganismos, como las PGPR. Los grupos comunes de fitohormonas incluyen giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides y auxinas, de modo que las células de la raíz pueden proliferar al sobreproducir raíces laterales y pelos absorbentes con un aumento consecutivo en la absorción de nutrientes y agua (Gouda et al., 2018).

Producción de exopolisacáridos. Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros biodegradables de alto peso molecular que se forman a partir de residuos de monosacáridos y sus derivados. Además, desempeñan un papel central en el mantenimiento del potencial hídrico, agregando partículas del suelo, asegurando el contacto obligatorio entre las raíces de las plantas y las rizobacterias,

apoyando al hospedante en condiciones de estrés (suelo salino, clima seco, registro de agua, patógenos) y, por lo tanto, son directamente responsables del crecimiento de la planta (Gouda et al., 2018).

Disminución de los niveles de etileno. Aunque el etileno es esencial para el crecimiento y desarrollo normal en las plantas, puede ser dañino en altas concentraciones, ya que induce defoliación y otros procesos celulares que pueden llevar a una reducción del rendimiento del cultivo (Bhattacharyya y Jha, 2012). Algunos fitopatógenos promueven la síntesis de etileno por parte de la planta, lo que aumenta la gravedad de una infección por hongos, mientras que algunos inhibidores de la síntesis de etileno disminuyen significativamente la severidad de ésta. Las PGPR reducen la concentración de etileno de la planta a través de la acción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, protegiéndola así del ataque de microorganismos (Sindhu et al., 2016).

2.1.1.2. Mecanismos Indirectos. Los mecanismos indirectos involucran el proceso a través del cual la PGPR previene o neutraliza los efectos nocivos de los fitopatógenos en las plantas al producir sustancias represivas que aumentan la resistencia natural del hospedante, mecanismo generalmente conocido como control biológico (Bhattacharyya y Jha, 2012; Gouda et al., 2018).

Producción de antibióticos. Los antibióticos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que actúan inhibiendo las actividades metabólicas de otros microorganismos. La síntesis de compuestos antibióticos es altamente efectiva para controlar y prevenir el crecimiento de patógenos. El modo de acción de los antibióticos aislados de los géneros bacterianos y fúngicos incluye la inhibición de la síntesis de la pared celular o de la membrana celular y el bloqueo de los complejos de iniciación del ARN ribosomal 30s (Mustafa et al., 2019). La producción de antibióticos por PGPR contra varios patógenos de plantas es uno de los mecanismos de control más efectivos y más estudiados en las últimas dos décadas (Gouda et al., 2018).

Resistencia sistémica inducida. La resistencia sistémica inducida (RSI) se define como un estado fisiológico de capacidad defensiva mejorada evocada en respuesta a un estímulo ambiental particular. Las rizobacterias inducen la resistencia sistémica en muchas plantas contra varios factores estresantes del ambiente. Se producen señales y se activa un mecanismo de defensa a través del sistema vascular durante la invasión por patógenos que resulta en la activación de un gran número de enzimas de defensa, como quitinasa, β -1, 3-glucanasa, fenilalanina amoniaco liasa,

polifenol oxidasa, peroxidasa, lipoxigenasa, SOD, CAT y APX junto con algunos inhibidores de proteinasa. La RSI no es específica contra un patógeno en particular, y ayuda a la planta a controlar a los fitopatógenos responsables de numerosas enfermedades (Bhattacharyya y Jha, 2012; Gouda et al., 2018).

Producción de compuestos orgánicos volátiles. Los compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por las cepas de control biológico promueven el crecimiento de las plantas, inhiben a los fitopatógenos (bacterianos y fúngicos) y nematodos, e inducen resistencia sistémica en las plantas contra microorganismos causantes de enfermedades. Los COV de las cepas de PGPR directa o indirectamente median una mayor resistencia a la enfermedad, tolerancia al estrés abiótico y biomasa vegetal, la cantidad y la identidad de los COV emitidos varían según la especie (Gouda et al., 2018). Se ha establecido que los COV producidos por las cepas rizobacterianas pueden actuar como una molécula de señalización para mediar en las interacciones planta-microorganismo, ya que los compuestos volátiles producidos por las raíces colonizadas por PGPR se generan en concentraciones suficientes para desencadenar las respuestas de la planta (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Antagonismo. Las rizobacterias pueden suprimir el crecimiento de varios fitopatógenos en diversas formas, como competir por nutrientes y espacio, limitando el suministro de Fe disponible a través de la producción de sideróforos, produciendo enzimas líticas, por ejemplo proteasa, lipasa, glucanasa, quitinasa y celulasa (Bhattacharyya y Jha, 2012; Mustafa et al., 2019).

2.1.2. Uso Potencial de Rizobacterias en la Agricultura

Las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR) funcionan como una coevolución entre plantas y microorganismos que muestran interacciones antagónicas y sinérgicas con los microorganismos y el suelo (Gouda et al., 2018). La comprensión de tan diversas habilidades de promoción del crecimiento de las PGPR ha llevado a su aplicación potencial en la agricultura sostenible (Mustafa et al., 2019).

Algunas de las características deseables de una PGPR para ser utilizada como agente de biocontrol incluyen: (a) la colonización eficiente de las raíces, (b) la capacidad de utilizar una variedad de

sustratos orgánicos que se encuentran generalmente en los exudados de las raíces y las semillas, (c) su fácil cultivo en condiciones de laboratorio, (d) producción de diversos metabolitos secundarios y (e) su compatibilidad con plaguicidas de uso común y otros agentes de biocontrol (Sindhu et al., 2016).

Algunos de los microorganismos benéficos comúnmente promovidos y utilizados en la agricultura mundial incluyen *Rhizobium*, *Mycorrhizae*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Streptomyces* y muchos más. Los experimentos en diferentes cultivos a nivel mundial muestran perspectivas alentadoras para la aplicación práctica de estos microorganismos benéficos para mejorar el rendimiento de los cultivos y la fertilidad del suelo, evitando así muchas restricciones y factores ambientales bióticos y abióticos (Dinu et al., 2018).

Las especies de *Bacillus* son particularmente atractivas como agentes de control biológico porque producen endosporas estables, que pueden sobrevivir al calor y las condiciones de desecación que pueden enfrentar los agentes de control biológico (Sindhu et al., 2016).

La identificación y selección de la cepa efectiva de PGPR para la comercialización también es uno de los grandes desafíos. Aunque muchos PGPR se comportan como buenos agentes de biocontrol en entornos de laboratorio, su comercialización exige la máxima funcionalidad en los campos agrícolas. Además, se requiere la demanda del mercado, la actividad efectiva y consistente, la mayor estabilidad, el bajo costo y la disponibilidad informal (Mustafa et al., 2019).

El éxito logrado por parte de las bacterias inoculadas depende de: (a) mantener las poblaciones apropiadas para garantizar un control biológico efectivo; (b) prolongación del período durante el cual un umbral de densidad de población es continuo en la rizosfera, y (c) aumento significativo del control biológico proporcionado por el inóculo de rizobacterias (Dinu et al., 2018).

2.2. Generalidades de *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Sclerotium rolfsii Sacc. es un hongo fitopatógeno con origen en el suelo, necrotrófico facultativo con gran capacidad de crecimiento saprofítico, agente causal de enfermedades de gran importancia agrícola por la magnitud de las pérdidas que ocasionan y la dificultad para combatirlas eficientemente. A dicha dificultad contribuyen de forma significativa varios factores como son: a) una amplia gama de plantas cultivadas y no cultivadas susceptibles al patógeno; b) la extensa

distribución geográfica de éste; y c) su capacidad de persistir prolongadamente en el suelo mediante la formación de esclerocios (Remesal-González, 2012).

2.2.1. Taxonomía de *Sclerotium rolfsii*

Este hongo fitopatógeno pertenece taxonómicamente a la división Basidiomycota, clase Basidiomycetes, orden Agaricales y, familia Typhulaceae (Bellé *et al.*, 2017).

2.2.2. Características Morfológicas y Fisiológicas de *Sclerotium rolfsii*

Lo más característico de *S. rolfsii* es la formación de abundante micelio blanco algodonoso y la producción de esclerocios como estructura de supervivencia, tanto en condiciones naturales como de laboratorio (Agrios, 2005; González, 2013; Mahadevakumar *et al.*, 2016; Paul *et al.*, 2017).

El crecimiento micelial se produce de forma rápida ya que una colonia sobre medio de cultivo sintético de papa dextrosa agar (PDA), es capaz de alcanzar los 9 cm de diámetro en 3 a 4 días de incubación a 25°C, con la formación de abundante micelio aéreo de color blanco a olivo pálido, con una tasa promedio de crecimiento colonial de 1.2–1.5 mm/día (Paul *et al.*, 2017; Remesal-González, 2012).

Las hifas de *S. rolfsii* son hialinas, de pared celular delgada, con formación de septos y un gran número de ramificaciones. Esto da lugar a que se diferencien tres tipos de estructuras hifales. Las primarias o hifas principales, de mayor diámetro (4.5–8 µm), con conexiones en argolla que dan lugar a las secundarias y terciarias, de menor diámetro (2–4.5 µm), y que además puede haber anastomosis entre ella (Remesal-González, 2012). Entretanto, los esclerocios tienden a ser esféricos (0.5–2 mm), formados lateralmente en hifas principales y donde se diferencian tres capas al madurar: una corteza exterior melanizada de dos a cuatro células de espesor, un córtex intermedio de seis a ocho células de espesor y una médula interior compuesta de hifas estrechamente entrelazadas entre sí (Remesal-González, 2012). Por lo general, son de color blanco

a marrón claro durante la primera etapa del crecimiento esclerótico, sin embargo, el color cambia a marrón canela o marrón oscuro con el tiempo (Paul et al., 2017).

En el estado sexual, se forman basidios libres que carecen de la protección que en otros basidiomicetos confiere el himenio. Los basidios son de forma ovalada y sobre ellos se forman cuatro basidiosporas haploides en los extremos de los esterigmas (Agrios, 2005; Remesal-González, 2012).

2.2.3. Síntomas Causados por *Sclerotium rolfii*

Las enfermedades causadas por *Sclerotium* spp. ocurren principalmente en climas cálidos, provocando marchitamiento de plántulas, canchales en tallo, tizón de la corona, así como pudrición de raíz, corona, bulbo, tubérculo y fruto (Agrios, 2005).

Las semillas son invadidas rápidamente por los hongos y luego mueren, las plantas que han desarrollado algo de tejido leñoso no son invadidas en su totalidad, pero el hongo crece en la corteza y rodea a la planta lenta o rápidamente, por lo que finalmente muere. Por lo general, la infección inicia en el tallo succulento como una lesión de color marrón oscuro justo debajo de la línea del suelo. Al principio, las hojas inferiores y luego las hojas superiores se vuelven amarillas o se marchitan y mueren. Las plantas afectadas mueren desde las puntas hacia abajo (muerte descendente). En plantas con tallos muy succulentos, como el apio (*Apium graveolens*), el tallo puede caerse; mientras que, en plantas con tallos más duros, como el tomate, el tallo invadido se mantiene erguido y comienza a perder sus hojas o marchitarse. Mientras tanto, el hongo crece hacia la parte superior de la planta, cubriendo la lesión del tallo con una masa de micelio algodonoso blanco. El avance del hongo hacia arriba depende principalmente de la presencia de alta humedad relativa en el ambiente. El hongo también se mueve rápidamente hacia las raíces y finalmente destruye el sistema radical. El micelio blanco está siempre presente en y sobre los tejidos infectados, y a partir de ellos crece sobre el suelo hasta las plantas adyacentes, lo que provoca nuevas infecciones (Paul et al., 2017). Los tejidos invadidos (tallo, tubérculos, fruto, etc.) suelen adquirir un color café pálido o claro, y consistencia suave pero no acuosa. Cuando se infectan las raíces o los bulbos carnosos, se puede desarrollar una pudrición blanda de tipo acuosa en las raíces

y bulbos, el bulbo completo de la cebolla se puede descomponer y desintegrar y ser reemplazado por residuos entrelazados con micelio y esclerocios del hongo. Si las raíces y los frutos se infectan al final de su desarrollo, los síntomas pueden pasar desapercibidos al momento de la cosecha, pero la enfermedad continúa como una pudrición de almacenamiento (Agrios, 2005).

2.2.4. Métodos de Control de *Sclerotium rolfsii*

Actualmente, el control de este hongo se efectúa mediante la implementación de técnicas culturales como la rotación de cultivos, la cual es poco satisfactoria debido al amplio rango de hospedantes de este hongo fitopatógeno. En el caso de la solarización del suelo y el arado profundo para enterrar los esclerocios fúngicos, estas estrategias tienen el inconveniente de la sobrevivencia de los esclerocios en el suelo; lo que limita su efectividad para el control de *Sclerotium rolfsii* (Agrios, 2005).

Del mismo modo, se ha empleado el uso de productos químicos de tipo amonio, compuestos de calcio y, en algunos casos fungicidas como Pentacloronitrobenceno (PCNB), causando resistencia a fungicidas y degradación del suelo (Agrios, 2005; Dwivedi y Prasad, 2016). Lo anterior con resultados poco satisfactorios, por lo que existe el interés en la búsqueda de alternativas que sean además de bajo impacto ambiental, por lo que se ha explorado el uso de agentes biológicos, tales como la aplicación de extractos de ajo (*Allium sativum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), rizoma de jengibre (*Zingiber officinale*), hoja de neem (*Azadirachta indica*), aceite de semilla de neem, rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa*), y bulbo de cebolla (*Allium cepa*), así como el estudio de la actividad de microorganismos antagonistas, entre los que encontramos principalmente a hongos del género *Trichoderma* y los géneros bacterianos *Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas* (Dwivedi y Prasad, 2016).

3. HIPÓTESIS

- Al menos uno de los aislados de *Bacillus* en estudio presentará una tasa de inhibición mayor a 50% contra *Sclerotium rolfsii* en condiciones *in vitro*.
- Al menos uno de los aislados de *Bacillus* en estudio presentará biocontrol superior al 50% contra *Sclerotium rolfsii* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.).
- Al menos uno de los aislados de *Bacillus* en estudio promoverá el crecimiento de plantas de tomate, berenjena y chile.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Aislar y caracterizar cepas de *Bacillus* spp. con actividad antagonista contra *Sclerotium rolfsii* y con capacidad de promoción de crecimiento en plantas.

4.2. Objetivos Específicos

- Aislar *Bacillus* de muestras de suelo de Sinaloa y Nayarit.
- Determinar la capacidad antagonista *in vitro* de aislados de *Bacillus* obtenidos de muestras de suelo contra el hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*.
- Caracterizar morfológica y molecularmente los aislados de *Bacillus* con la mejor capacidad antagonista *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii*.
- Determinar la capacidad antagonista de aislados de *Bacillus* obtenidos de muestras de suelo contra *Sclerotium rolfsii* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), berenjena (*Solanum melongena* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.)
- Estimar la promoción de crecimiento en plantas de tomate, berenjena y chile inducida por los aislados de *Bacillus* obtenidos de muestras de suelos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Muestreo de Suelos

A partir de campos agrícolas con presencia del hongo *Sclerotium rolfsii* y distribuidos en los estados de Sinaloa y Nayarit, México, se recolectaron muestras de suelo de la zona cercana a la raíz de plantas sanas mediante un muestreo aleatorio compuesto que consistió en tomar varias submuestras (5 en total) de aproximadamente 100 g cada una, y se mezclaron para obtener una muestra compuesta de cada sitio de muestreo (NOM-021-SEMARNAT-2000).

5.2. Aislamiento y Purificación de Bacterias a Partir de Muestras de Suelo

En lo que respecta al aislamiento de bacterias, se disolvieron 10 g de las muestras de suelo en 90 mL de agua destilada estéril. Los frascos se calentaron a 80 °C en un baño María durante 1 h con el objetivo de asegurar únicamente la supervivencia de microorganismos termófilos. La suspensión se sembró en medio de cultivo agar nutritivo usando un asa bacteriológica, las cajas Petri se incubaron a 27 °C durante 48 h.

Para la purificación de los aislados bacterianos, las cajas Petri conteniendo bacterias con 48 h de crecimiento se observaron en un microscopio estereoscópico, a fin de seleccionar aquellas colonias que presentaron morfologías distintas. Dichas colonias se transfirieron a una nueva caja Petri con agar nutritivo, lo cual se repitió hasta tener colonias con una única morfología (Schaad et al., 2001).

5.3. Evaluación *in vitro* de Actividad Antagonista Contra *Sclerotium rolfii*

5.3.1. Material Biológico

Suspensión bacteriana de los aislados obtenidos de muestras de suelo de los estados de Sinaloa y Nayarit, y el patógeno *Sclerotium rolfii* proporcionado por el cepario de fitopatología de CIAD Culiacán, aislado de un cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) con sintomatología de marchitez ubicado en el campo experimental de INIFAP Culiacán.

5.3.2. Técnica de Cultivo Dual

Para evaluar la actividad antagonista de los aislados bacterianos contra *Sclerotium rolfii* se empleó la técnica de cultivo dual.

Esta prueba consistió en colocar un disco de 6 mm de diámetro conteniendo micelio de *S. rolfii* en el centro de una caja Petri de 90 × 15 mm con medio de cultivo agar nutritivo. En los cuatro puntos cardinales alrededor de éste y a una distancia de 20 mm, se colocaron discos de papel Whatman de 6 mm de diámetro impregnados con 5 µL (3×10^8 UFC/mL) de suspensión bacteriana (Mejía-Bautista et al., 2016; Ríos-Velasco et al., 2016), y se incubaron a temperatura de 27 ± 1 °C. En el tratamiento testigo, solo se colocaron discos de papel Whatman impregnados con agua destilada estéril alrededor del disco micelial. Además, se contó con un aislado de *Bacillus subtilis* como control positivo de actividad antagonista. Los datos de crecimiento micelial radial de *S. rolfii* se registraron hasta el momento en que el crecimiento del micelio en el tratamiento control alcanzó los bordes de los discos de papel. Se midió el área clara entre el disco impregnado con suspensión bacteriana y el disco con micelio del patógeno a fin de determinar la inhibición del crecimiento por parte del antagonista; finalmente, se calculó la tasa de inhibición (%) tal como se muestra a continuación:

$$n = a - \frac{b}{a} \times 100 \quad (1)$$

donde n = porcentaje de longitud del área de inhibición; a =crecimiento radial del control y b = crecimiento radial del patógeno.

5.3.3. Diseño Experimental

Se construyó un diseño de un factor completamente al azar, donde el factor fue el aislado bacteriano, los tratamientos fueron los aislados obtenidos, un tratamiento testigo (agua destilada estéril) y un control positivo (cepa comercial de *Bacillus subtilis*) (Cuadro 1). La unidad experimental fue una caja Petri con un disco micelial de *Sclerotium rolfsii* y se realizaron 4 réplicas por tratamiento. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y para las comparaciones entre tratamientos se utilizó una prueba de comparación de medias Tukey, empleando el software estadístico Minitab 18. Los aislados que presentaron una tasa de inhibición igual o superior al 50%, se seleccionaron para la evaluación de su actividad antagonista *in vivo* contra *S. rolfsii* (Ley-López et al., 2018; Tejera-Hernández et al., 2011), así como para su caracterización morfológica y molecular.

Cuadro 1. Tratamientos para la evaluación *in vitro* de actividad antagonista de aislados bacterianos contra *Sclerotium rolfsii*.

Tratamiento	Aislado
1	S3-1
2	S5-3
3	S5-2
4	S2-1
5	S3-3
6	S4-1
7	S2-3
8	S1-3
9	N4-2
10	N8-2
11	N5-7
12	N7-1
13	N6-2
14	N4-5
15	L-1
16	L-2
17	Testigo
18	Control positivo

5.4. Caracterización de Aislados Bacterianos con la Mejor Capacidad Antagonista *in vitro* Contra *Sclerotium rolfsii*

5.4.1. Caracterización Morfológica

Se observaron al microscopio las características coloniales (forma, margen, pigmento, superficie, elevación y consistencia) de los aislados bacterianos con mayor antagonismo y promoción de crecimiento (Schaad et al., 2001).

5.4.2. Tinción de Gram

Siguiendo la técnica propuesta por Schaad et al. (2001) previo a las tinciones fue necesario realizar un frotis, para lo cual se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, se suspendió una colonia bacteriana con 24 h de crecimiento, se secó al aire y se fijó con calor. Una vez preparado el frotis se adicionó cristal violeta, se dejó actuar durante 1 min, se decantó el colorante inicial, se agregó solución lugol con un pH de 7.5, dejando actuar durante 1 min, se decantó la solución lugol y se lavó con alcohol al 96 % hasta un aclarado completo del colorante. Posteriormente, se adicionó solución de safranina al 1 % y se dejó actuar durante 30 s. Por último, se lavó con agua corriente, se dejó secar al aire y se observó al microscopio compuesto con el objetivo 100X.

Las células bacterianas teñidas de color azul o morado (retenidas en el cristal violeta) se consideraron como Gram positivas, mientras que aquellas que se decoloraron con el alcohol al 96 % y adquirieron un color rojo o rosa (dado por la safranina) se consideraron como Gram negativas (Schaad et al., 2001).

5.4.3. Tinción de Endosporas

Siguiendo la metodología propuesta por Schaad et al. (2001), se realizó un frotis como se explicó anteriormente, a continuación, se cubrió la preparación con verde de malaquita y se calentó a emisión de vapores durante 1 min, utilizando unas pinzas y algodón humedecido con alcohol. Es necesario evitar que el colorante hierva y que la muestra se seque, añadir más colorante si este se evapora. Posteriormente se lavó con abundante agua el exceso de colorante, se añadió safranina como colorante de contraste, se dejó actuar durante 1 min, y se lavó con abundante agua el exceso de colorante. Finalmente, la preparación se secó al aire y se observó al microscopio compuesto con el objetivo 100X.

5.4.4. Extracción de ADN, Amplificación por PCR y Secuenciación

Para la extracción de ADN, se usaron colonias bacterianas cultivadas en medio agar nutritivo a 27 °C por 24 h. Cada colonia bacteriana se suspendió en 100 µL de agua destilada estéril, se agitó durante 1 min en un vortex S0200 (Labnet, México), se calentó durante 15 min a 95 °C en un horno de secado FE-293AD (Labnet, México), se retiró e inmediatamente se enfrió en hielo a -20 °C durante 7 min. Posteriormente, se centrifugó en una microcentrífuga Sorvall Legend Micro 21 (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) a 10,000 g durante 10 min. Por último, el sobrenadante se decantó y la pastilla obtenida se resuspendió en 40 µL de agua destilada estéril. La concentración y la pureza del ADN extraído se determinó en un Nanodrop One (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) utilizando 2 µL del lisado para la lectura. El lisado obtenido se conservó a -20 °C hasta su uso.

La amplificación se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) en un termociclador T100TM (Bio-Rad, EE. UU.), para obtener un fragmento del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (aproximadamente de 1500 pb), usando como molde el lisado y los iniciadores FD2 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y RP1 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACC-3') (Weisburg et al., 1991). Se consideró como control un blanco sin ADN molde y un testigo positivo que consistió en ADN de *Bacillus subtilis*. La mezcla de amplificación se preparó utilizando el sistema comercial Go Taq PCR Core System I, bajo las condiciones previamente descritas por Weisburg et al. (1991) y McLaughlin et al. (2012) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Condiciones de la amplificación por PCR, para los iniciadores FD2 y RP1 que codifican para el ARNr 16S.

Condiciones	Temperatura	Tiempo	
Activación de la enzima	95 °C	5 min	
Desnaturalización	94 °C	1 min	} 30 ciclos
Alineamiento	56 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	10 min	

Los productos de PCR, se analizaron por electroforesis en una cámara Powerpac™ Basic (Bio-Rad, EE. UU.) en gel de agarosa al 1 %, en amortiguador TAE (242 g Tris, 100 mL Tris-HCl, pH 8.0, 57.1 mL ácido acético glacial, 1:1 agua destilada); aplicando 70 V y 400 mA, durante 70 min. Previamente, los geles se tiñeron con GelRed™ Nucleid Acid (Biotium, EE. UU.), se visualizaron con un fotodocumentador Gel Doc™ XR + Imaging System (Bio-Rad, EE. UU.). Se utilizaron 5 µL de producto de PCR y como marcador de tamaño 1 µL del marcador molecular de 1 kb (Promega, EE. UU.). Los fragmentos obtenidos (~1500 pb) se purificaron siguiendo el protocolo del kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EE. UU.).

Los amplicones purificados se secuenciaron en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGE BIO) del CINVESTAV, unidad Irapuato, Guanajuato.

Las secuencias obtenidas se compararon mediante la herramienta BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con las secuencias previamente reportadas. Las secuencias obtenidas de este estudio se depositaron en el GenBank.

5.5. Evaluación *in vivo* de Actividad Antagonista Contra *Sclerotium rolfsii* y Promoción de Crecimiento de Plantas

5.5.1. Material Biológico

Para la evaluación *in vivo* de actividad antagonista contra *Sclerotium rolfsii* y promoción de crecimiento de plantas se utilizaron plántulas de tomate cv. Sun 6200 (Nunhems, México), berenjena cv. Barcelona (Arroyabe, Colombia) y chile cv. HM 179 F1 (Harris Moran, China) de 21 días de crecimiento después de germinado. Además, se utilizó una suspensión bacteriana de las cepas bajo estudio a una concentración de 1×10^5 UFC/mL y el inóculo del patógeno *S. rolfsii* a una concentración de 3×10^3 fragmentos miceliales/mL.

5.5.2. Inoculación

Bajo condiciones de invernadero, plántulas individuales de tomate, berenjena y chile se transfirieron a macetas de 0.5 Kg de capacidad previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%, conteniendo una mezcla de sustrato estéril conformada de Sogemix PG-M y suelo (70 y 30%, respectivamente). Las plántulas se inocularon con 50 mL de la suspensión bacteriana correspondiente.

Para la evaluación *in vivo* de la actividad antagonista, previo al trasplante se realizó la inoculación del patógeno mediante la técnica de inmersión de raíz en suspensión de fragmentos miceliales de *Sclerotium rolfsii*. La inoculación del patógeno y del antagonista se realizó el mismo día y la eficacia biológica se calculó considerando la sintomatología ocasionada por la enfermedad y utilizando la escala de severidad (Cuadro 3) reportada por Paredes-Escalante et al. (2009).

Cuadro 3. Escala de severidad de la enfermedad causada por *Sclerotium rolfsii*.

Valor de escala	Descripción del daño causado por <i>Sclerotium rolfsii</i>
0	Planta sana.
1	Planta clorótica.
2	Planta marchita.
3	Planta muerta.

$$\% SD = \sum \left(\frac{GD \times NP}{EM \times TP} \right) \times 100 \quad (2)$$

donde: % SD= porcentaje de severidad de la enfermedad; GD= grado de severidad;
NP=número de plantas dañadas; EM= grado de severidad máximo de la escala de severidad y
TP= número de plantas del tratamiento.

La efectividad biológica de los aislados bacterianos contra *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate, berenjena y chile, se calculó con la fórmula propuesta por Lou y Zhou (1994).

$$\% EB = \frac{SD \text{ del control} - SD \text{ del tratamiento}}{SD \text{ del control}} \times 100 \quad (3)$$

donde: % EB= porcentaje de eficiencia biológica; SD del tratamiento= media de severidad de la enfermedad por tratamiento y SD del control= media de severidad de la enfermedad del control.

La determinación de la promoción del crecimiento en planta se realizó tanto en plantas no inoculadas como inoculadas con el patógeno. Para lo cual se registró la altura de planta (cm), la cual se midió con una cinta métrica convencional desde la base de la planta hasta la parte más alta en el ápice, mientras que el grosor del tallo (mm) se midió en la base o cuello de la planta con un calibrador digital CALDI-6MP (Truper, México), ambas mediciones se realizaron semanalmente durante cinco semanas. En cuanto a la obtención del peso seco (g), las plantas se extrajeron de la maceta al finalizar las cinco semanas, se lavaron con agua destilada, se escurrieron sobre papel absorbente, se colocaron en una estufa de secado FE-293AD (Labnet, México) dentro de bolsas de papel y finalmente se pesaron en una balanza analítica PX224/E (Ohaus, EE. UU.) (Kumar et al., 2020; Ramavath et al., 2019).

5.5.3. Diseño Experimental

Para la evaluación de la actividad antagonista *in vivo* contra *Sclerotium rolfsii* se construyó un diseño de dos factores de efectos fijos, totalmente al azar, donde los factores fueron la cepa bacteriana (5 cepas bacterianas seleccionadas por su actividad antagonista *in vitro*, testigo inoculado únicamente con el patógeno y *B. subtilis* comercial como control positivo) y el cultivo (tomate, berenjena y chile). La unidad experimental fue una maceta con una planta, según el

cultivo, y se realizaron 4 réplicas por tratamiento (Cuadro 4). La variable de respuesta fue la efectividad biológica (%) (Fórmula 3). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y las diferencias entre medias mediante la prueba de comparación de medias de Tukey, utilizando el software estadístico Minitab 18.

Cuadro 4. Tratamientos para la evaluación *in vivo* de actividad antagonista de las cepas bacterianas seleccionadas contra *Sclerotium rolfsii*.

Trat.	Aislado	Cultivo	Trat.	Aislado	Cultivo	Trat.	Aislado	Cultivo
1	B.cer3	Tomate	8	B.cer3	Chile	15	B.cer3	Berenjena
2	B.cer1	Tomate	9	B.cer1	Chile	16	B.cer1	Berenjena
3	B.amy	Tomate	10	B.amy	Chile	17	B.amy	Berenjena
4	B.pse	Tomate	11	B.pse	Chile	18	B.pse	Berenjena
5	B.vel	Tomate	12	B.vel	Chile	19	B.vel	Berenjena
6	Ctrl +	Tomate	13	Ctrl +	Chile	20	Ctrl +	Berenjena
7	T. inoc	Tomate	14	T. inoc	Chile	21	T. inoc	Berenjena

B.cer3= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3. B.cer1= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3. B.amy= *B. amyloliquefaciens*. B.pse= *B. pseudomycoides*. B.vel= *B. velezensis*. Ctrl + = control positivo. T.inoc= testigo inoculado.

Para la evaluación de promoción del crecimiento en planta se consideraron dos diseños experimentales. El primero fue un diseño de tres factores cruzados con medidas repetidas en el tiempo, donde cada tratamiento está dado por la combinación de los factores **cepa bacteriana** (5 cepas bacterianas seleccionadas por su actividad antagonista *in vitro*, testigo y *B. subtilis* comercial como control positivo), **cultivo** (tomate, berenjena y chile) y **patógeno** (ausencia o presencia de *S. rolfsii*), a través del **tiempo** (5 semanas). La unidad experimental fue una maceta con una planta, según el cultivo, y se realizaron 4 réplicas por tratamiento (Cuadro 5). Las variables respuesta para este diseño fueron el incremento en altura de la planta (cm) y el incremento en el grosor del tallo (mm).

Cuadro 5. Tratamientos para la evaluación del crecimiento de plantas promovido por las cepas bacterianas seleccionadas, para las variables respuesta incremento en altura de planta e incremento en grosor de tallo.

Semana*								
Patógeno	Aislado	Cultivo	Patógeno	Aislado	Cultivo	Patógeno	Aislado	Cultivo
Presencia	B.cer3	Tomate	Presencia	B.cer3	Chile	Presencia	B.cer3	Berenjena
Presencia	B.cer1	Tomate	Presencia	B.cer1	Chile	Presencia	B.cer1	Berenjena
Presencia	B.amy	Tomate	Presencia	B.amy	Chile	Presencia	B.amy	Berenjena
Presencia	B.pse	Tomate	Presencia	B.pse	Chile	Presencia	B.pse	Berenjena
Presencia	B.vel	Tomate	Presencia	B.vel	Chile	Presencia	B.vel	Berenjena
Presencia	Ctrl +	Tomate	Presencia	Ctrl +	Chile	Presencia	Ctrl +	Berenjena
Presencia	Testigo	Tomate	Presencia	Testigo	Chile	Presencia	Testigo	Berenjena
Ausencia	B.cer3	Tomate	Ausencia	B.cer3	Chile	Ausencia	B.cer3	Berenjena
Ausencia	B.cer1	Tomate	Ausencia	B.cer1	Chile	Ausencia	B.cer1	Berenjena
Ausencia	B.amy	Tomate	Ausencia	B.amy	Chile	Ausencia	B.amy	Berenjena
Ausencia	B.pse	Tomate	Ausencia	B.pse	Chile	Ausencia	B.pse	Berenjena
Ausencia	B.vel	Tomate	Ausencia	B.vel	Chile	Ausencia	B.vel	Berenjena
Ausencia	Ctrl +	Tomate	Ausencia	Ctrl +	Chile	Ausencia	Ctrl +	Berenjena
Ausencia	Testigo	Tomate	Ausencia	Testigo	Chile	Ausencia	Testigo	Berenjena

*Fue necesaria la construcción de un cuadro para cada semana evaluada. B.cer3= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3. B.cer1= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3. B.amy= *B. amyloliquefaciens*. B.pse= *B. pseudomycoides*. B.vel= *B. velezensis*. Ctrl + = control positivo.

El segundo fue un diseño de tres factores, de efectos fijos, completamente al azar, con los factores **cepa bacteriana** (5 cepas bacterianas seleccionadas por su actividad antagonista *in vitro*, testigo y *B. subtilis* comercial como control positivo), **cultivo** (tomate, berenjena y chile) y **patógeno** (ausencia o presencia de *S. rolfsii*). La unidad experimental fue una maceta con una planta, según el cultivo, y se realizaron 4 réplicas por tratamiento (Cuadro 6). La variable de respuesta fue el peso seco (g) por planta. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y las comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey, usando el software estadístico Minitab 18.

Cuadro 6. Tratamientos para la evaluación del crecimiento de plantas promovido por las cepas bacterianas seleccionadas, para la variable respuesta peso seco.

Patógeno	Aislado	Cultivo	Patógeno	Aislado	Cultivo	Patógeno	Aislado	Cultivo
Presencia	B.cer3	Tomate	Presencia	B.cer3	Chile	Presencia	B.cer3	Berenjena
Presencia	B.cer1	Tomate	Presencia	B.cer1	Chile	Presencia	B.cer1	Berenjena
Presencia	B.amy	Tomate	Presencia	B.amy	Chile	Presencia	B.amy	Berenjena
Presencia	B.pse	Tomate	Presencia	B.pse	Chile	Presencia	B.pse	Berenjena
Presencia	B.vel	Tomate	Presencia	B.vel	Chile	Presencia	B.vel	Berenjena
Presencia	Ctrl +	Tomate	Presencia	Ctrl +	Chile	Presencia	Ctrl +	Berenjena
Presencia	Testigo	Tomate	Presencia	Testigo	Chile	Presencia	Testigo	Berenjena
Ausencia	B.cer3	Tomate	Ausencia	B.cer3	Chile	Ausencia	B.cer3	Berenjena
Ausencia	B.cer1	Tomate	Ausencia	B.cer1	Chile	Ausencia	B.cer1	Berenjena
Ausencia	B.amy	Tomate	Ausencia	B.amy	Chile	Ausencia	B.amy	Berenjena
Ausencia	B.pse	Tomate	Ausencia	B.pse	Chile	Ausencia	B.pse	Berenjena
Ausencia	B.vel	Tomate	Ausencia	B.vel	Chile	Ausencia	B.vel	Berenjena
Ausencia	Ctrl +	Tomate	Ausencia	Ctrl +	Chile	Ausencia	Ctrl +	Berenjena
Ausencia	Testigo	Tomate	Ausencia	Testigo	Chile	Ausencia	Testigo	Berenjena

B.cer3= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3. B.cer1= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3. B.amy= *B. amyloliquefaciens*. B.pse= *B. pseudomycoides*. B.vel= *B. velezensis*. Ctrl + = control positivo.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Muestreo de Suelos

Se muestrearon un total de 13 sitios distribuidos en los estados de Sinaloa y Nayarit, México. Se recolectaron muestras de suelo alrededor de las raíces de plantas sanas ubicadas en campos agrícolas con cultivo de garbanzo con presencia del hongo *S. rolfsii*. Además, se muestrearon suelos agrícolas sin la presencia del patógeno. La ubicación y coordenadas de los puntos seleccionados se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Localización geográfica de los sitios considerados para el muestreo de suelos.

No. sitio	Municipio	Coordenadas
1	Culiacán, Sinaloa	24°54'20" N 107°42'27" O
2	Angostura, Sinaloa	25°12'37" N 107°59'28" O
3	Salvador Alvarado, Sinaloa	25°28'13" N 108°12'46" O
4	Salvador Alvarado, Sinaloa	25°27'13" N 108°11'40" O
5	Guasave, Sinaloa	25°30'28" N 108°20'14" O
6	Mocorito, Sinaloa	25°8'21" N 107°57'5" O
1	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°43'40" N 105°15'13" O
2	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°43'18" N 105°15'35" O
3	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°43'20" N 105°15'20" O
4	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°44'27" N 105°16'37" O
5	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°49'39" N 105°4'36" O
6	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°49'46" N 105°4'58" O
7	Santiago Ixcuintla, Nayarit	21°49'53" N 105°5'59" O
8	Rosamorada, Nayarit	21°57'48" N 105°13'8" O

6.2. Aislamiento y Purificación de Bacterias a Partir de Muestras de Suelo

De las muestras de suelo se obtuvieron un total de 16 aislados bacterianos, los cuales se identificaron mediante una clave que consta de: una letra, que se refiere a la entidad federativa a la que corresponde el sitio de muestreo de la muestra de suelo considerada para el aislado (S para Sinaloa, N para Nayarit, L para muestras recibidas por el Laboratorio de Fitopatología CIAD

Culiacán); seguida por un número, el cual indica el número del sitio de muestreo asignado en esa entidad federativa en particular; y por último, un número después de un guión que hace referencia al número designado para ese aislado, en ese sitio de muestreo específico. Por ejemplo, el aislado identificado como S3-1 corresponde al primer aislado bacteriano designado para el sitio de muestreo 3 ubicado en el estado de Sinaloa.

Los aislados bacterianos se describieron de acuerdo con la morfología colonial presentada en medio de cultivo agar nutritivo. Dichas características fueron desde circulares a filamentosas, con bordes enteros o irregulares, de consistencia seca o mucoide, planas, acuminadas o crateriformes, rugosas o lisas. En el Cuadro 8 se muestra una descripción detallada de la morfología colonial de cada uno de los aislados bacterianos obtenidos.

Cuadro 8. Descripción de la morfología colonial de los aislados bacterianos obtenidos de muestras de suelos.

Aislado	Color	Tamaño	Aspecto	Forma	Borde	Elevación	Superficie
S3-1	Blanco	Grande	Seca	Circular	Entero	Plana	Lisa, mate
S5-3	Blanco	Pequeño	Seca	Rizoide	Lobulado	Plana	Lisa, mate
S5-2	Blanco	Grande	Seca	Circular	Entero	Crateriforme	Lisa, brillante
S2-1	Blanco	Grande	Mucoide	Circular	Entero	Convexa	Rugosa, mate
S3-3	Blanco	Grande	Mucoide	Circular	Entero	Plana	Rugosa, brillante
S4-1	Blanco	Mediano	Seca	Circular	Entero	Acuminada	Rugosa, brillante
S2-3	Blanco	Grande	Seca	Circular	Entero	Convexa	Lisa, brillante
S1-3	Blanco	Grande	Mucoide	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa, brillante
N4-2	Blanco	Mediano	Mucoide	Circular	Entero	Elevada	Lisa, mate
N8-2	Blanco	Pequeño	Seca	Puntiforme	Ondulado	Plana	Lisa, brillante
N5-7	Blanco	Pequeño	Seca	Circular	Ondulado	Crateriforme	Rugosa, brillante
N7-1	Blanco	Grande	Mucoide	Irregular	Entero	Convexa	Lisa, mate
N6-2	Blanco	N/A	Seca	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Lisa, mate
N4-5	Blanco	Grande	Mucoide	Circular	Entero	Elevada	Lisa, mate
N4-1	Blanco	Grande	Seca	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa, brillante
L-1	Blanco	Mediano	Seca	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa, mate
L-2	Blanco	Grande	Mucoide	Irregular	Ondulado	Convexa	Lisa, cremosa

6.3. Evaluación *in vitro* de Actividad Antagonista Contra *Sclerotium rolfsii*.

En el Cuadro 9 se presenta el resultado del análisis de varianza, en el que se observaron diferencias significativas entre los aislados bacterianos evaluados, mismas que pueden atribuirse directamente al factor en cuestión, al presentar una contribución a la variabilidad de los datos del 96.26%.

Cuadro 9. Análisis de Varianza (ANOVA) para la tasa de inhibición (%) de crecimiento micelial de *Sclerotium rolfii* por parte de los aislados bacterianos, después de cuatro días de crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo.

Fuente	GL	Contribución	Valor F	Valor P
Aislado	17	96.26%	408.56	0.000
Error	270	3.74%		
Total	287	100%		

R²=96.26%. GL= grados de libertad. Valor F= valor de prueba del estadístico F. Valor P= nivel de significancia.

Los resultados obtenidos mostraron que 14 de 16 aislados bacterianos evaluados, presentaron una tasa de inhibición significativamente mayor con respecto al testigo absoluto, excepto los aislados L-1 y N8-2. Existen diferentes criterios de selección de agentes biocontroladores durante la etapa *in vitro*, sin embargo; el más utilizado es aquel que considera como agentes de control biológico prometedores a bacterias cuya tasa de inhibición sea superior a 50% (Ley-López et al., 2018; Tejera-Hernández et al., 2011). Por lo tanto, los aislados N6-2, S3-3, S1-3, N7-1 y L-2, con tasas de inhibición de 69.18, 60.22, 59.33, 56.53 y 55%, respectivamente (Figura 1), se seleccionaron para pruebas posteriores *in vivo* en condiciones de invernadero. Los aislados seleccionados presentaron mayor tasa de inhibición que la cepa de *Bacillus subtilis* utilizada como control positivo (52.40%) (Figura 2) por lo que representan una alternativa viable para el control biológico de *S. rolfii*.

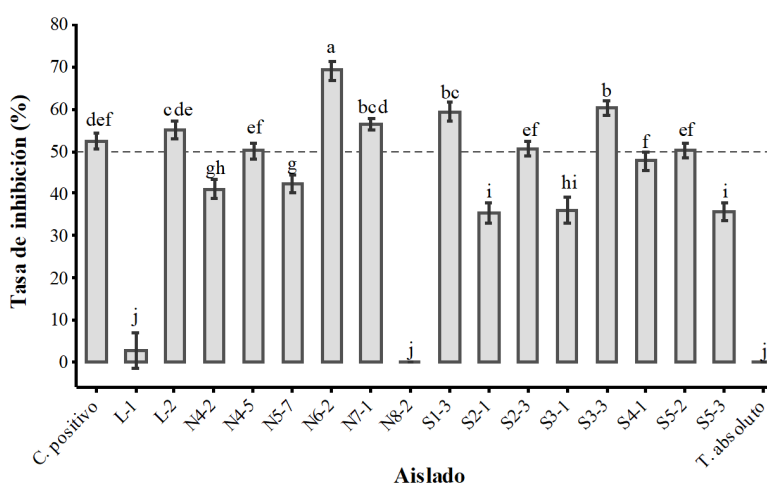


Figura 1. Tasa de inhibición de crecimiento micelial de *Sclerotium rolfii* por parte de los aislados bacterianos. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (P= 0.05).

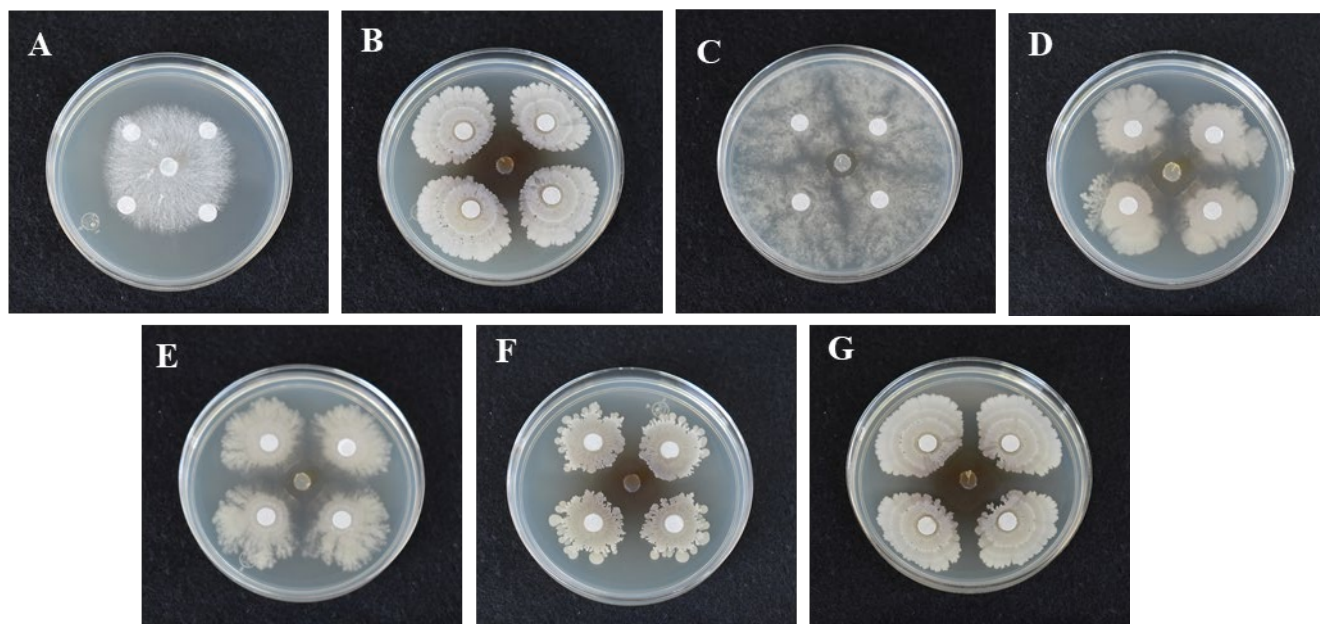


Figura 2. Inhibición de crecimiento micelial de *Sclerotium rolfii* por parte de los aislados bacterianos, (A) testigo, (B) control positivo, (C) N6-2, (D) S3-3, (E) S1-3, (F) N7-1 y (G) L-2.

Los resultados de antagonismo *in vitro* de los aislados bacterianos seleccionados son comparables a los reportados en otras investigaciones en las que se evaluó el uso de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, ampliamente conocidas por su capacidad de control biológico de hongos fitopatógenos como *S. rolfii* (Mustafa et al., 2019). Tal es el caso del trabajo realizado por Paredes-Escalante et al. (2009), quienes obtuvieron tasas de inhibición de 75.4 y 56.9% para *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente. En este sentido, se ha evaluado la actividad antagonista de *P. fluorescens* y *P. cf. monteilii* 9 sobre *S. rolfii* con tasa de inhibición del 21.80–82.56% y 94%, respectivamente. No obstante, los autores señalaron el inconveniente que representó el uso de *Pseudomonas* en los cultivos, al ser un posible agente causal de enfermedades en humanos, por lo que es necesaria la realización de pruebas previas antes de su aplicación a fin de asegurar la inocuidad de los alimentos (Rakh et al., 2011; Sahni et al., 2019). Del mismo modo, se ha demostrado la acción que tienen los aislados del género *Bacillus* en el control de *S. rolfii* en condiciones *in vitro*, ya que se han reportado tasas de inhibición de 47% y hasta 78.02% utilizando *Bacillus* sp. como organismos de prueba (Sahu et al., 2019).

En la Figura 2 se observan halos de inhibición de crecimiento micelial con delimitación cuadrangular por acción de los aislados bacterianos frente al hongo, esto puede deberse a la producción de metabolitos antifúngicos difusibles en el medio de cultivo (Mejía-Bautista et al.,

2016).

6.4. Caracterización de Aislados Bacterianos con la Mejor Capacidad Antagonista *in vitro* Contra *Sclerotium rolfsii*

6.4.1. Caracterización Morfológica

En cuanto al crecimiento en medio de cultivo agar nutritivo, todos los aislados bacterianos formaron colonias grandes de color blanco cremoso. El aislado S3-3 se caracterizó por tener colonias con aspecto mucoide, superficie rugosa y brillante, forma circular con borde entero y sin elevación. Las colonias del aislado S1-3 presentaron aspecto mucoide, forma irregular con borde ondulado, superficie rugosa y brillante, y sin elevación. El aislado N7-1 exhibió un aspecto mucoide, forma irregular con borde entero, elevación convexa y una superficie lisa y mate. Por último, el aislado N6-2 presentó colonias con forma filamentosa sin elevación, aspecto seco, superficie lisa y mate (Figura 3).

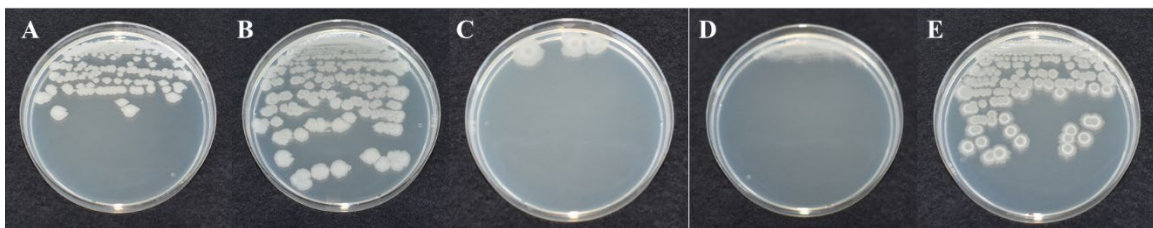


Figura 3. Morfología de las colonias de los aislados bacterianos seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones *in vitro* después de 48 h de crecimiento en agar nutritivo, (A) S3-3, (B) S1-3, (C) N7-1, (D) N6-2, (E) L-2.

Todos los aislados bacterianos mostraron células con forma bacilar, mientras que los resultados de la tinción Gram (Figura 4) indicaron que se trató de bacterias Gram positivas en todos los casos. Entretanto, los resultados de la tinción de esporas (Figura 5) revelaron que todos los aislados

producen esporas maduras a partir del quinto día de crecimiento en agar nutritivo. De acuerdo con los resultados de la caracterización morfológica, estos correspondieron a los reportados para el género *Bacillus* (Schaad et al., 2001).

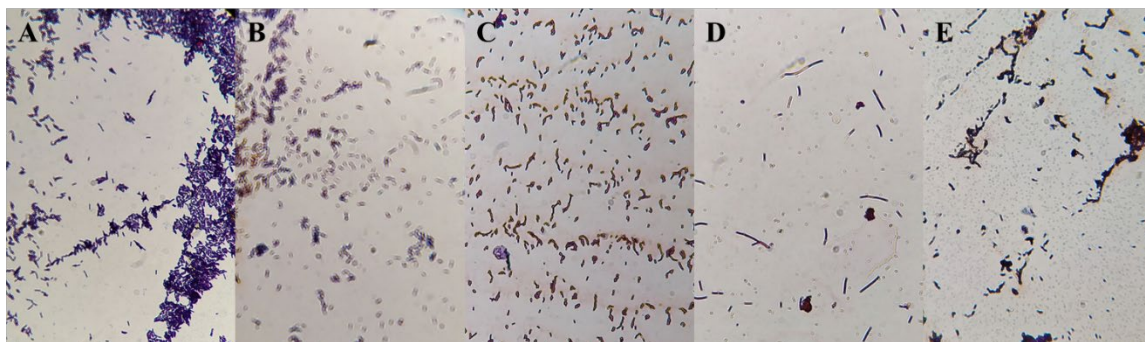


Figura 4. Tinción Gram positiva y forma bacilar de los aislados seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones *in vitro* después de 24 h de crecimiento en agar nutritivo, (A) S3-3, (B) S1-3, (C) N7-1, (D) N6-2, (E) L-2.

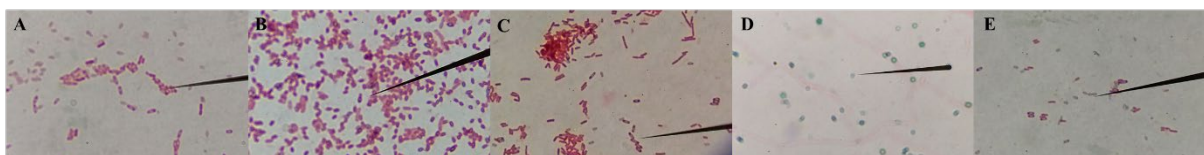


Figura 5. Tinción de esporas de los aislados seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones *in vitro* después de cinco días de crecimiento en agar nutritivo, (A) S3-3, (B) S1-3, (C) N7-1, (D) N6-2, (E) L-2.

6.4.2. Identificación Molecular de las Bacterias

Los productos de amplificación del fragmento correspondiente al gen que codifica al ARN ribosomal 16S mostraron un amplicón de aproximadamente 1500 pb (Figura 6) para los aislados N6-2, S3-3, S1-3, N7-1 y L-2. Los resultados del alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST y los números de acceso de las secuencias depositadas se muestran en el Cuadro 10.

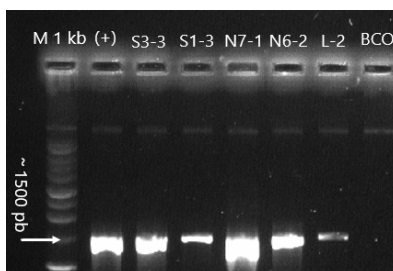


Figura 6. Amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores FD2 y RP1 para ADN bacteriano de los aislados N6-2, S3-3, S1-3, N7-1 y L-2. Gel de agarosa al 1 %, donde se observa la amplificación del fragmento de 1500 pb. Carril 1: marcador molecular de 1 kb, carril 2: control positivo (ADN de *Bacillus subtilis*), carril 3: aislado S3-3, carril 4: aislado S1-3, carril 5: aislado N7-1, carril 6: aislado N6-2, carril 7: aislado L-2.

Cuadro 10. Identidad de los aislados bacterianos seleccionados por la capacidad antagonista presentada en condiciones *in vitro* contra *Sclerotium rolfii*.

Aislado	Bacteria	Identidad	No. de acceso en el GenBank	Cepa de referencia (No. acceso en el GenBank)
N6-2	<i>B. pseudomycoides</i>	96.51%	MT772178	NR_113991
S3-3	<i>B. cereus</i>	100%	MT772181	NR_074540
S1-3	<i>B. cereus</i>	100%	MT772180	NR_074540
N7-1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99.76%	MT772179	NR_117946
L-2	<i>B. velezensis</i>	99.53%	MT772177	NR_116240

6.5. Evaluación *in vivo* De La Actividad Antagonista Contra *Sclerotium rolfii* y Promoción De Crecimiento De Plantas

6.5.1. Evaluación *in vivo* de Actividad Antagonista Contra *Sclerotium rolfii*

En el experimento *in vivo* para el caso de la actividad antagonista contra *S. rolfii*, es importante mencionar que los síntomas se observaron durante la quinta semana en todas las plantas de los tres diferentes cultivos (Figura 8), siendo únicamente la cepa bacteriana inoculada el factor significativo en cuanto a la efectividad biológica para el control del hongo (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis de Varianza (ANOVA) para la efectividad biológica (%) sobre *Sclerotium rolfsii* por parte de las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.

Fuente	GL	Contribución	Valor F	Valor P
Cultivo	2	1.23%	1.62	0.207
Bacteria	6	67.43%	29.54	0.000
Cultivo*Bacteria	12	7.37%	1.62	0.110
Error	63	23.97%		
Total	83	100%		

R²=90.30%. GL= grados de libertad. Valor F= valor de prueba del estadístico F. Valor P= nivel de significancia.

Todas las cepas evaluadas presentaron mejor efectividad biológica (91-100%) con respecto al testigo inoculado, siendo superior a la efectividad biológica mostrada por el control positivo empleado (83%) (Figura 7), lo que indicó que las cepas bacterianas obtenidas son mejores en cuanto a su actividad de biocontrol que el testigo comercial empleado. Cabe resaltar que, la efectividad biológica reportada para las cepas evaluadas en la presente investigación fue superior a la efectividad biológica reportada en otras investigaciones, como en los casos de *Pseudomonas cf. monteilii* 9 y *Bacillus velezensis* cuyo porcentaje de control de la enfermedad de la pudrición del tallo del cacahuate (*Arachis hypogaea*) causada por *S. rolfsii* fue de 45.45 a 66.67% (Rakh et al., 2011) y 62.6 a 70.8 % (Chen et al., 2019), respectivamente.

La diferencia mostrada entre los resultados de la evaluación *in vitro* en comparación con la evaluación *in vivo*, se observó y justificó por diversos autores, quienes señalaron que dicha diferencia está dada por la diversidad de condiciones ambientales bióticas (presencia de otros organismos) y abióticas (temperatura, humedad, luz, etc.) a las que se exponen tanto los agentes de biocontrol como el fitopatógeno durante su aplicación en invernadero o en campo, en comparación con el ambiente controlado que se maneja en las pruebas de laboratorio, las cuales pueden potenciar o disminuir la acción de control biológico.

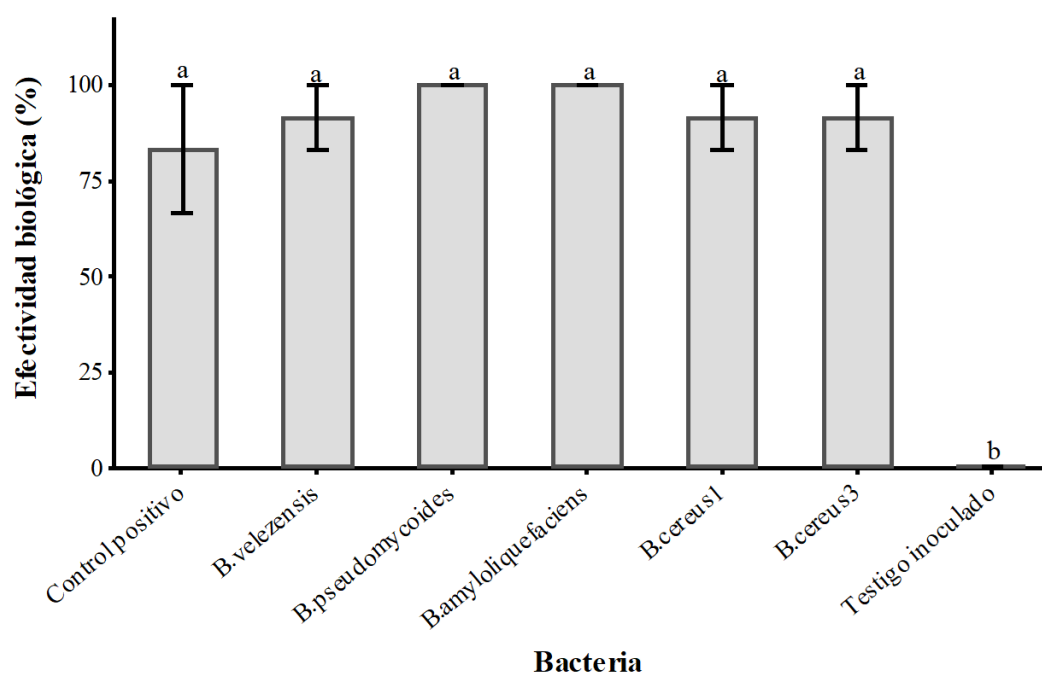


Figura 7. Efectividad biológica de las cepas bacterianas evaluadas contra *Sclerotium rolfsii* (se refiere al promedio de las plantas para todos los cultivos evaluados). *B. cereus*1= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, *B. cereus*3= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P=0.05$).

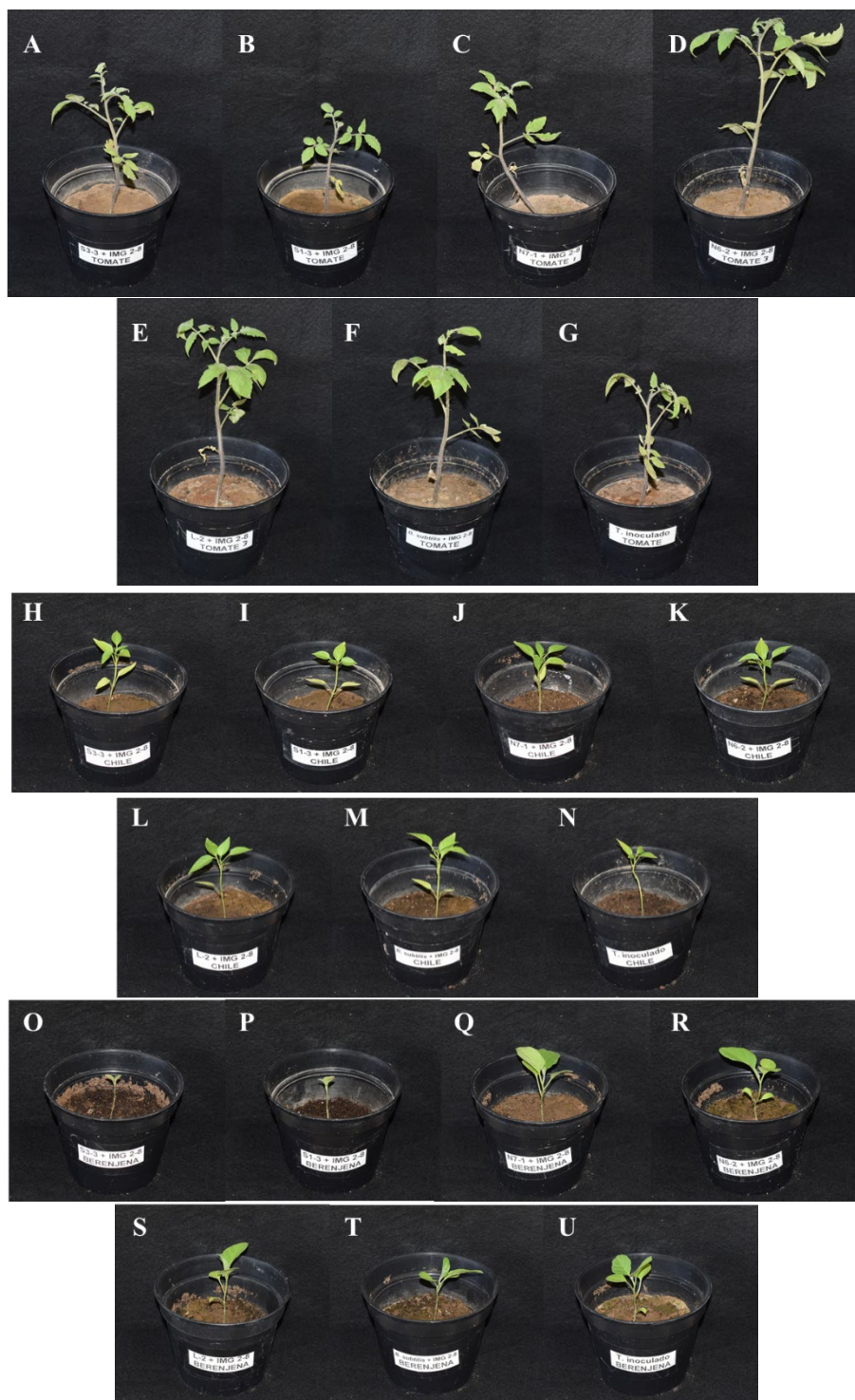


Figura 8. Efecto de biocontrol de las cepas sobre *S. rolfsii* cinco semanas después de la inoculación, (A) planta de tomate con *S. rolfsii* + *B. cereus* identificado como el aislado S3-3; (B) planta de tomate con *S. rolfsii* + *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, (C) planta de tomate con *S. rolfsii* + *B. amyloliquefaciens*, (D) planta de tomate con *S. rolfsii* + *B. pseudomycoides*, (E) planta de tomate con *S. rolfsii* + *B. velezensis*, (F) planta de tomate con *S. rolfsii* + control positivo, (G) planta de tomate con *S. rolfsii*. (H) planta de chile con *S. rolfsii* + *B. cereus* identificado como el aislado S3-3; (I) planta de chile con *S. rolfsii* + *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, (J) planta de chile con *S. rolfsii* + *B.*

amyloliquefaciens, (K) planta de chile con *S. rolfsii* + *B. pseudomycoides*, (L) planta de chile con *S. rolfsii* + *B. velezensis*, (M) planta de chile con *S. rolfsii* + control positivo, (N) planta de chile con *S. rolfsii*. (O) planta de berenjena con *S. rolfsii* + *B. cereus* identificado como el aislado S3-3; (P) planta de berenjena con *S. rolfsii* + *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, (Q) planta de berenjena con *S. rolfsii* + *B. amyloliquefaciens*, (R) planta de berenjena con *S. rolfsii* + *B. pseudomycoides*, (S) planta de berenjena con *S. rolfsii* + *B. velezensis*, (T) planta de berenjena con *S. rolfsii* + control positivo, (U) planta de berenjena con *S. rolfsii*.

Además, se decidió reportar los resultados de antagonismo *in vivo* en términos de la severidad de la enfermedad (%) presentada en cada uno de los tratamientos (Figura 9), encontrando diferencias significativas entre las cepas evaluadas, pudiendo seleccionar a *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus velezensis* como agentes de biocontrol prometedores. Coincidiendo con lo reportado por (Paredes-Escalante et al., 2009) para control de la marchitez del garbanzo ocasionada por *S. rolfsii* por parte de *B. subtilis* y *P. flourescens* con valores entre 0.52–10.39%.

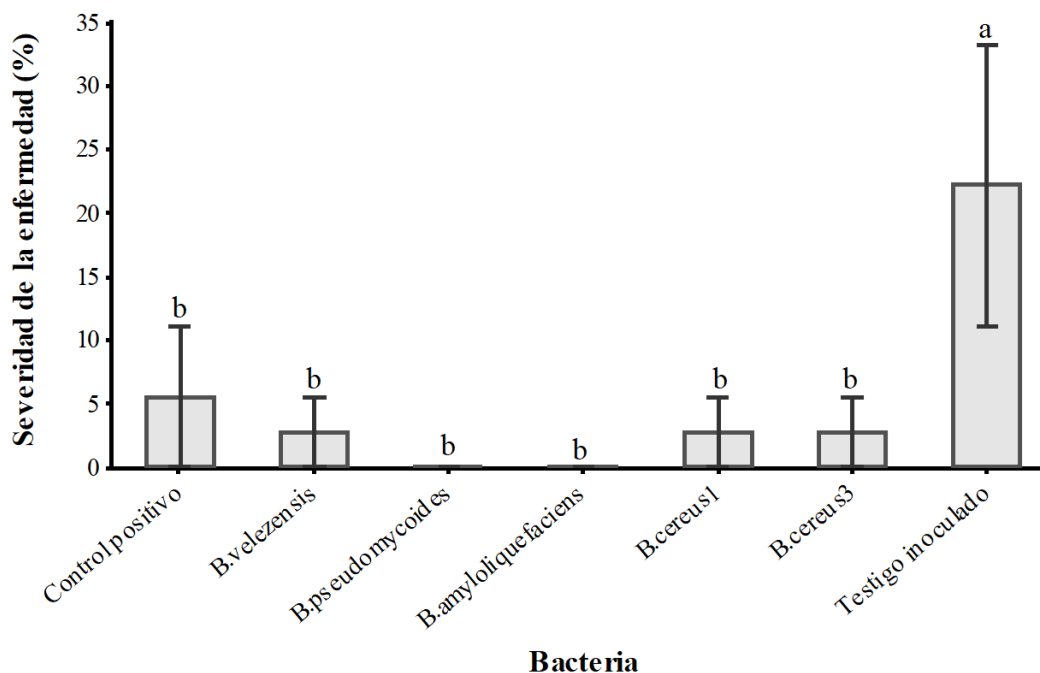


Figura 9. Severidad de la enfermedad mostrada en plantas inoculadas con las cepas bacterianas evaluadas contra *Sclerotium rolfsii* (se refiere al promedio de las plantas para todos los cultivos evaluados). *B.cereus1*= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, *B.cereus3*= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($P= 0.05$).

6.5.2. Evaluación de Promoción de Crecimiento de Plantas

Por otro lado, en la evaluación de promoción del crecimiento de plantas se evaluaron las variables respuesta altura y grosor del tallo a lo largo de cinco semanas, y el peso seco de las plantas al finalizar las cinco semanas del experimento (Figura 13).

En cuanto a la variable respuesta incremento en altura de planta (Figura 10), tanto los efectos principales como los efectos de interacción de los factores evaluados resultaron ser significativos, excepto la interacción triple entre cultivo, patógeno y aislado bacteriano inoculado (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de Varianza (ANOVA) para el incremento en la altura de las plantas (cm) promovido por las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.

Fuente	GL	Contribución	Valor F	Valor P
Cultivo	2	25.32%	407.32	0.000
Patógeno	1	11.53%	370.86	0.000
Cultivo*Patógeno	2	2.62%	42.13	0.000
Bacteria	6	4.42%	23.68	0.000
Cultivo*Bacteria	12	3.35%	8.99	0.000
Patógeno*Bacteria	6	0.98%	5.25	0.000
Tiempo	4	35.46%	1136.42	0.000
Cultivo*Tiempo	8	2.99%	47.98	0.000
Patógeno*Tiempo	4	1.96%	62.81	0.000
Bacteria*Tiempo	24	1.73%	9.24	0.000
Cultivo*Patógeno*Bacteria	12	0.79%	2.13	0.020
Unidad experimental (Cultivo, Patógeno, Bacteria)	126	3.92%	3.99	0.000
Error	632	4.93%		
Total	839	100%		

R²=95.07%. GL= grados de libertad. Valor F= valor de prueba del estadístico F. Valor P= nivel de significancia.

En la Figura 10A correspondiente al gráfico de efectos principales para la variable respuesta en cuestión, se observó para el caso del cultivo una notoria diferencia en el incremento en la altura de las plantas, siendo el tomate el cultivo que alcanzó mayores valores con respecto a los otros 2 (chile y berenjena), logrando un incremento de hasta 12 cm en la altura de las plantas. Esto se explica al analizar los cultivos y cultivares empleados en el experimento, ya que el cv. de tomate Sun 6200

presenta crecimiento indeterminado, por lo que los tallos principal y lateral crecen en un patrón continuo, sin que la aparición de inflorescencias limite su crecimiento, pudiendo alcanzar alturas superiores a los 2 m (López-Marín, 2017), mientras que los cultivares de berenjena (Barcelona) y chile (HM 179 F1) presentaron altura de planta promedio de 0.7–1.0 m (González-Lavaut et al., 2007) y 0.5–1.5 m (Anguiano-Barrales, 2010), respectivamente; a pesar de que el cultivar de berenjena seleccionado presenta crecimiento indeterminado.

En cuanto al factor patógeno, es evidente que en aquellas plantas en las que el patógeno se encontró ausente, alcanzaron incrementos de altura superiores a los alcanzados por las plantas inoculadas con *S. rolfii*, ya que el crecimiento de las plantas se alteró en presencia del fitopatógeno. Por otra parte, se observó que la mayoría de las cepas bacterianas indujeron un incremento de altura en las plantas (9–10 cm) con respecto al testigo (menor a 8 cm), excepto las dos cepas de *B. cereus* evaluadas (6–7 cm), siendo las cepas de *B. pseudomycooides* y *B. velezensis* las que promovieron los valores más altos de incremento en altura, por encima del control positivo comercial empleado. De manera general, el comportamiento a través en el tiempo fue lógico de suponer, ya que el incremento en altura de la planta fue directamente proporcional al tiempo en el que fueron evaluadas las plantas durante el desarrollo del experimento.

Analizando las interacciones entre los factores evaluados en el experimento, encontramos que las plantas inoculadas con bacterias tuvieron alturas muy similares al inicio del experimento sin embargo, con el paso de las semanas se observó el potencial en la promoción del crecimiento (Figura 10B) ya que, las cepas de *B. cereus* mostraron poca inducción del incremento de altura en las plantas, mientras que las cepas de *B. pseudomycooides* y *B. velezensis* provocaron un incremento en la altura de las planta equiparable al obtenido mediante la inoculación del control comercial, ya que no fue posible observar diferencias significativas entre estos y el control positivo, lo que plantea su posible aplicación en campo.

La presencia del patógeno a lo largo del tiempo (Figura 10C) frenó el crecimiento de las plantas en las últimas dos semanas del experimento, cuando también se presentaron los síntomas de la enfermedad. Dicho comportamiento no se observó en las plantas donde el patógeno se encontraba ausente y en las que el incremento en altura se mantuvo constante durante todo el experimento.

Cabe resaltar, que se registró un mayor incremento en altura de las plantas de tomate, con una curva muy pronunciada a través del tiempo. Mientras que, las plantas de chile exhibieron menor incremento en altura y una curva con un detenimiento en el incremento en altura en la cuarta

semana del experimento (Figura 10D). Esto puede deberse a los requerimientos nutricionales de los cultivos empleados, puesto que en el experimento se planteó el mismo manejo agronómico para todos los cultivos. En el Cuadro 13 se presenta una comparación de los requerimientos de los principales macronutrientes para tomate y chile, a manera de ejemplo.

Cuadro 13. Requerimientos nutricionales de los principales macronutrientes para tomate y chile.

Cultivo	Nitrógeno (kg/ton fruto)	Potasio (kg/ton fruto)	Fósforo (kg/ton fruto)
Tomate	2.2–2.4	2.6–3.6	0.2–0.4
Chile	2.4–4.0	3.4–5.3	0.4–1.0

La diferencia en el incremento en altura de plantas de chile y berenjena no fue significativa en ausencia de *S. rolfsii*, siendo muy diferente para el caso de tomate (Figura 10E).

Por otro lado, se observó que el tomate fue el cultivo que mejor respondió a la inoculación con bacterias, presentando incremento de altura superior al resto de los cultivos y diferencias significativas en la variable respuesta entre las cepas de *Bacillus* spp. inoculadas en dicho cultivo (Figura 10E). A diferencia del chile, en el cual no se observaron diferencias significativas entre las cepas bacterianas evaluadas, y de la berenjena que registró un comportamiento negativo con la inoculación de ambas cepas de *B. cereus*, lo que explica el comportamiento reflejado en el gráfico de efectos principales para las cepas en cuestión (Figura 10A).

De manera general, en la interacción entre plantas y organismos benéficos intervienen diversos factores bióticos y abióticos de los que depende la actividad que los segundos ejercen sobre los primeros (Gouda et al., 2018; Mustafa et al., 2019). En el caso particular del cultivo de chile se ha reportado la actividad de promoción de crecimiento por parte de *Bacillus* spp. con altura de planta que va de 2.91 a 4.09 cm (Yanti et al., 2020), de manera similar a lo encontrado en la presente investigación.

En la interacción de las cepas bacterianas con el patógeno ocurrió algo interesante (Figura 10E), ya que se observó claramente la promoción de crecimiento dada por las bacterias cuando el patógeno se encontraba presente, al ser superior el incremento en altura con respecto al testigo

inoculado únicamente con el patógeno, lo que reflejó la actividad de las bacterias para actuar en presencia del fitopatógeno y hace posible diferenciar entre ellas, siendo *B. pseudomycoides*, la especie que promovió mayor incremento en altura de planta en presencia de *S. rolfii*. Muestra de esto fue que en los casos donde el patógeno se encontró ausente, las bacterias tuvieron comportamientos muy similares y no fue posible hacer una diferenciación entre estas mediante métodos gráficos.

En cuanto a la variable respuesta incremento en grosor de tallo (Figura 11), tanto los efectos principales como los efectos de interacción doble entre los factores evaluados fueron estadísticamente significativos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis de Varianza (ANOVA) para el incremento en el grosor del tallo (mm) promovido por las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.

Fuente	GL	Contribución	Valor F	Valor P
Cultivo	2	5.01%	47.11	0.000
Patógeno	1	11.48%	215.94	0.000
Cultivo*Patógeno	2	3.46%	32.56	0.000
Bacteria	6	1.83%	5.74	0.000
Cultivo*Bacteria	12	9.28%	14.56	0.000
Patógeno*Bacteria	6	1.41%	4.43	0.000
Tiempo	4	43.20%	678.96	0.000
Cultivo*Tiempo	8	2.38%	18.69	0.000
Patógeno*Tiempo	4	2.37%	37.27	0.000
Bacteria*Tiempo	24	1.11%	2.90	0.000
Cultivo*Patógeno*Bacteria	12	1.72%	2.70	0.003
Unidad experimental (Cultivo, Patógeno, Bacteria)	126	6.70%	3.34	0.000
Error	632	10.05%		
Total	839	100%		

R²=89.95%. GL= grados de libertad. Valor F= valor de prueba del estadístico F. Valor P= nivel de significancia.

Para el factor cultivo (Figura 11A), la berenjena presentó el mayor incremento en grosor de tallo (1.1 mm). Es importante mencionar que a pesar de que los cultivos seleccionados pertenecen a la familia Solanaceae, existen diferencias entre ellos, ya que incluso existen diferencias entre las variedades pertenecientes a un mismo cultivo. En este sentido, el cultivar de berenjena

seleccionado para los experimentos presenta tallos fuertes y resistentes (González-Lavaut et al., 2007), siendo la posible razón por la cual fue el cultivo con mayor incremento en grosor de tallo. En el caso de la inoculación del patógeno, fue obvio que la presencia de *S. rolfii* disminuyó el crecimiento de las plantas evaluadas, ya que se observó el mismo comportamiento que para la variable respuesta incremento en altura de planta. Las cepas de *Bacillus* spp. inoculadas presentaron diferencias significativas, destacándose *B. pseudomycooides* como la que promovió un mayor incremento en grosor de tallo (aproximadamente 1.0 mm), seguido de *B. velezensis* y *B. amyloliquefaciens* (superior a 0.8 mm), mientras las cepas de *B. cereus* provocaron incremento en grosor de tallo por debajo del control positivo y del testigo. El incremento en grosor de tallo se mantuvo constante a través de las cinco semanas en las que se realizaron las evaluaciones durante el experimento.

La actividad de las cepas bacterianas evaluadas se diferenció notablemente a partir de la tercera semana del experimento (Figura 11B), lo que pudo deberse al tiempo que le tomó a las bacterias adaptarse y colonizar la rizosfera, previo al inicio de su actividad de promoción de crecimiento (Gouda et al., 2018). En este sentido, no se observaron diferencias significativas de *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* sobre la variable respuesta en cuestión con respecto al control positivo, y fue *B. pseudomycooides* la que presentó el mayor incremento en grosor de tallo de todas las cepas bacterianas evaluadas. Las cepas de *B. cereus* presentaron menor incremento en grosor de tallo que el testigo empleado. Lo anterior permitió determinar una marcada diferencia en el incremento en el grosor del tallo entre aquellas plantas inoculadas con el patógeno (0.2–1.0 mm) y aquellas que se inocularon únicamente con las bacterias (0.4–1.8 mm), a partir de la segunda semana del experimento (Figura 11C).

El efecto de la interacción entre los factores cultivo y tiempo evaluados en este experimento (Figura 11D) permitió corroborar que la berenjena fue el cultivo que presentó los valores más altos de incremento en grosor de tallo, mientras el tomate y el chile no exhibieron diferencias significativas. Los cultivos de chile y berenjena resultaron drásticamente afectados en el incremento del grosor del tallo en presencia del patógeno (Figura 11E). Entretanto, la interacción del cultivo con la cepa bacteriana arrojó datos curiosos, ya que una de las cepas de *B. cereus* exhibió los mejores resultados en tomate; sin embargo, presentó los valores más bajos de incremento en grosor del tallo para berenjena y chile, siendo más evidente en berenjena. Lo que nos lleva a retomar la postura de la complejidad de las relaciones que establecen los microorganismos benéficos con las plantas

hospedantes (Mustafa et al., 2019). En cuanto a *B. pseudomycooides* y *B. velezensis*, estas obtuvieron los mejores valores de la variable con respecto al testigo al ser inoculados en berenjena.

La actividad de promoción de incremento de la variable por parte de *B. velezensis* y *B. cereus* se alteró negativamente en presencia de *Sclerotium rolfsii*, lo que indicó que no son viables para su aplicación si se busca la acción dual de antagonismo y promoción de crecimiento para futuras aplicaciones. Por el contrario, *B. pseudomycooides* y *B. amyloliquefaciens* obtuvieron los mejores desempeños al incrementar el grosor del tallo, tanto en presencia como en ausencia del patógeno evaluado.

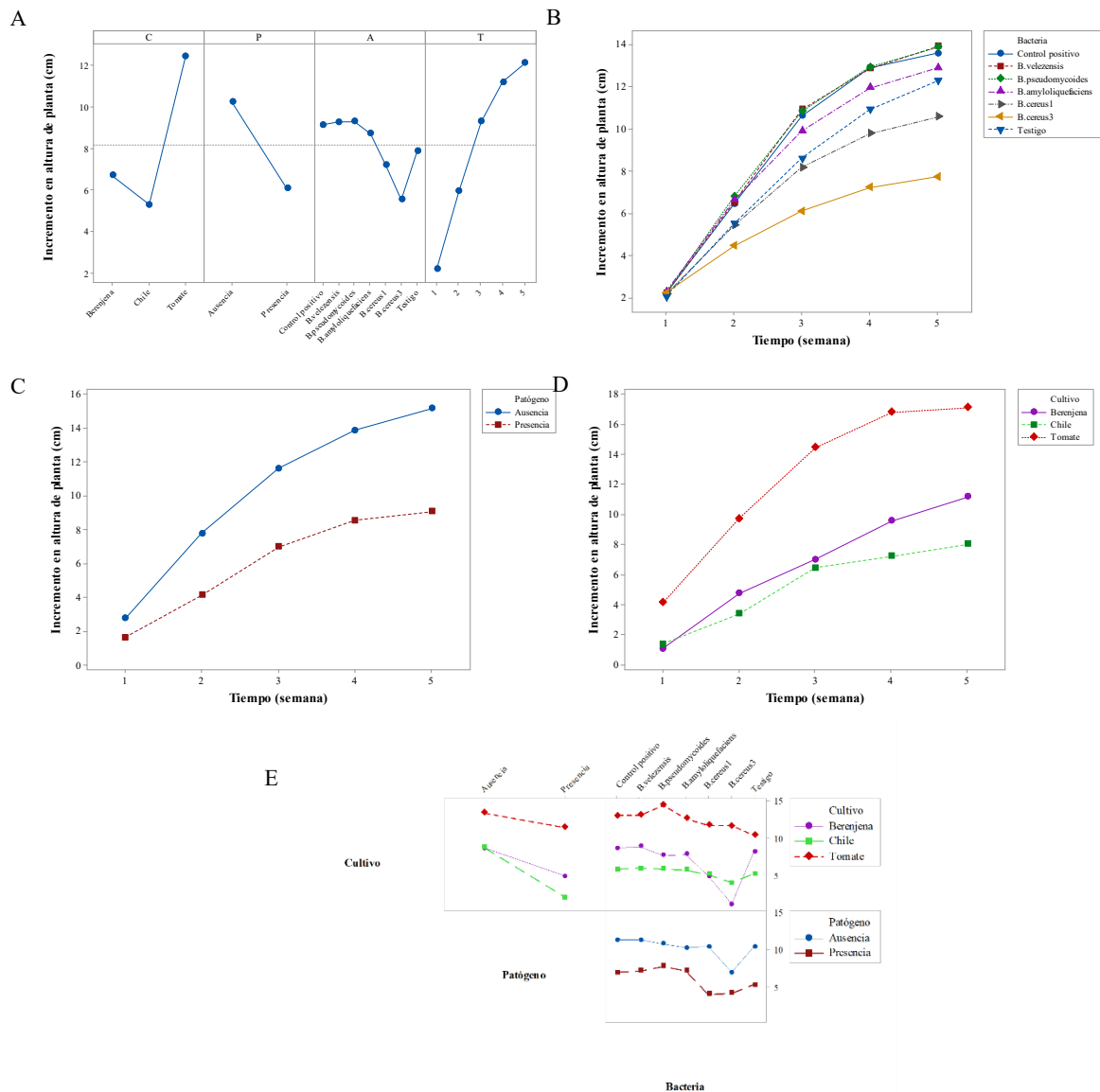


Figura 10. Gráficos de efectos principales e interacciones para el incremento en la altura de planta. (A) Gráfico de efectos principales de los factores C= cultivo, P= patógeno, B= bacteria y T= tiempo. (B) Gráfico de interacción entre bacteria inoculada y tiempo, *B.cereus1*= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, *B.cereus3*= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3 (se refiere al promedio de todos los cultivos). (C) Gráfico de interacción entre el patógeno inoculado y tiempo (se refiere al promedio de todos los cultivos). (D) Gráfico de interacción entre los cultivos evaluados y el tiempo (se refiere al promedio de todas las cepas bacterianas inoculadas). (E) Gráfico de interacciones dobles entre los factores cultivo, patógeno y bacteria inoculada.

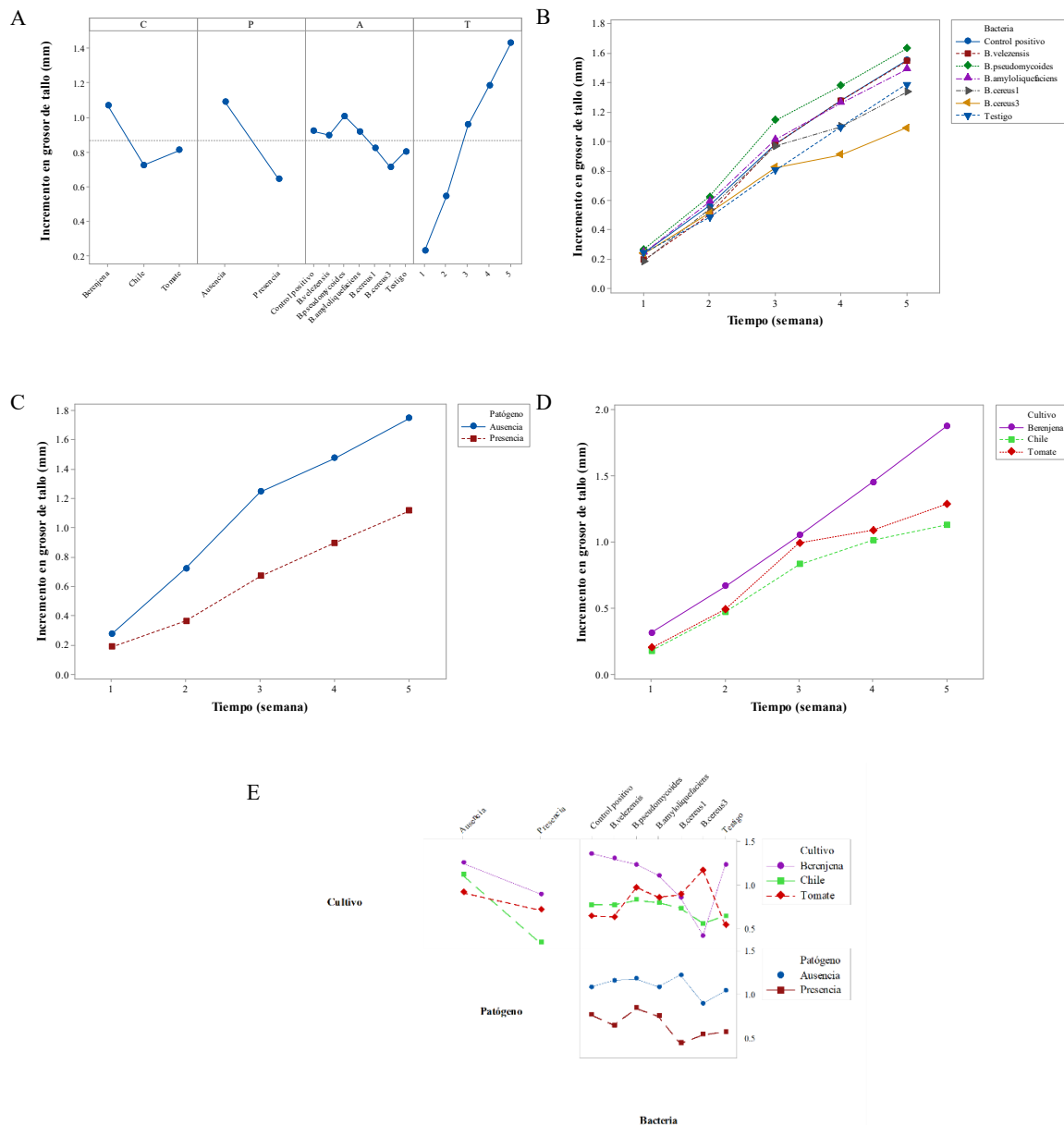


Figura 11. Gráficos de efectos principales e interacciones para el incremento en el grosor del tallo. (A) Gráfico de efectos principales de los factores C= cultivo, P= patógeno, B= bacteria y T= tiempo. (B) Gráfico de interacción entre bacteria inoculada y tiempo, *B.cereus1*= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, *B.cereus3*= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3 (se refiere al promedio de todos los cultivos). (C) Gráfico de interacción entre el patógeno inoculado y tiempo (se refiere al promedio de todos los cultivos). (D) Gráfico de interacción entre los cultivos evaluados y el tiempo (se refiere al promedio de todas las cepas bacterianas inoculadas). (E) Gráfico de interacciones dobles entre los factores cultivo, patógeno y bacteria inoculada.

La última variable respuesta evaluada en el experimento de promoción de crecimiento de planta fue el peso seco. Los efectos principales y de interacción doble de los factores evaluados resultaron significativos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis de Varianza (ANOVA) para el peso seco (g) de planta promovido por las cepas bacterianas en los cultivos evaluados.

Fuente	GL	Contribución	Valor F	Valor P
Cultivo	2	46.66%	232.54	0.000
Patógeno	1	20.35%	202.85	0.000
Bacteria	6	8.80%	14.62	0.000
Cultivo*Patógeno	2	1.51%	7.52	0.001
Cultivo*Bacteria	12	3.54%	2.94	0.001
Patógeno*Bacteria	6	3.64%	6.04	0.000
Cultivo*Patógeno*Bacteria	12	2.86%	2.38	0.008
Error	126	12.64%		
Total	167	100%		

$R^2=87.36\%$. GL= grados de libertad. Valor F= valor de prueba del estadístico F. Valor P= nivel de significancia.

Al igual que para las otras variables respuesta en este experimento, la presencia del patógeno resultó en menores valores de peso seco en las plantas evaluadas (Figura 12A). El cultivo con mayor biomasa fue el tomate (1.1 g), con el doble del peso seco de chile y berenjena. Únicamente las cepas de *B. pseudomycoides* y *B. velezensis* indujeron datos de peso seco superiores al testigo y al control positivo, esto aunado a los resultados de incremento en altura de planta y de incremento en grosor de tallo, postula a *B. pseudomycoides* como candidato idóneo para pruebas posteriores y su posible aplicación en campo.

La diferencia del efecto del patógeno sobre el cultivo estuvo dada por la inoculación del patógeno en tomate, ya que los valores de peso seco entre chile y berenjena no difirieron considerablemente tanto en ausencia como en presencia de *Sclerotium rolfsii* (Figura 12B). Los resultados de peso seco obtenidos en este estudio, concuerdan con lo reportado en otros trabajos con plantas de tomate inoculadas con *Bacillus* sp., en las que hubo un aumento en la acumulación de masa seca (1.79-1.87 g) en comparación con un control inoculado con *S. rolfsii* (Kumar et al., 2020).

Bacillus pseudomycoides fue la especie que indujo mayores valores de peso seco en tomate, siendo este cultivo el que presentó el peso seco más alto de todos. A diferencia de *B. cereus*, la cual fue la especie que promovió la menor acumulación de peso en todos los cultivos evaluados. En el caso de las cepas bacterianas inoculadas en chile, no hubo diferencias significativas, obteniendo valores semejantes de peso seco entre sí y con el testigo empleado. Lo anterior permitió observar que la presencia del patógeno no limitó la capacidad para acumular biomasa, ya que las plantas inoculadas

con bacteria presentaron valores de peso seco más altos que el testigo inoculado con el patógeno (Figura 12B). En un ambiente abierto, interactúan plantas, microorganismos benéficos y fitopatógenos, por lo que este último análisis reveló la conveniencia de la aplicación de rizobacterias en los sistemas agrícolas.

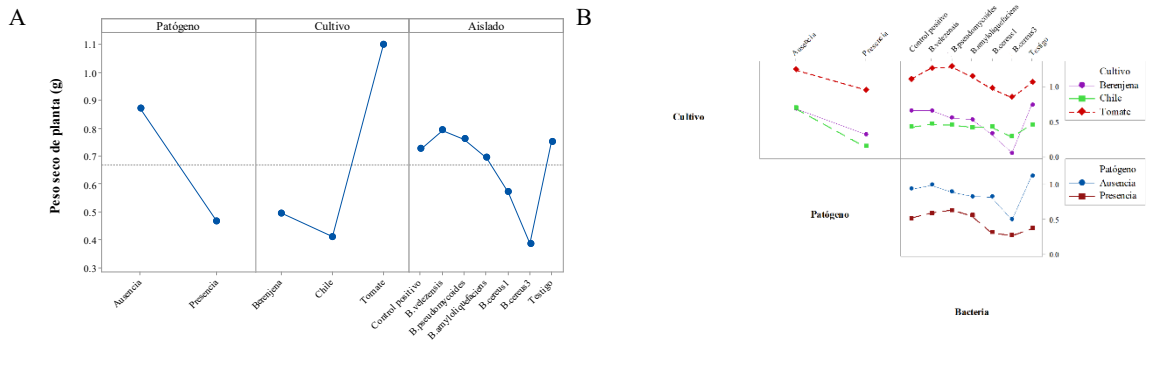


Figura 12. Gráficos de efectos principales e interacciones para el peso seco. (A) Gráfico de efectos principales de los factores C= cultivo, P= patógeno, B= bacteria y T= tiempo. (B) Gráfico de interacciones dobles entre los factores cultivo, patógeno y bacteria inoculada (*B.cereus*1= *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, *B.cereus*3= *B. cereus* identificado como el aislado S3-3).



Figura 13. Crecimiento de plantas promovido por las cepas bacterianas cinco semanas después de la inoculación, (A) planta de tomate con *B. cereus* identificado como el aislado S3-3; (B) planta de tomate con *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, (C) planta de tomate con *B. amyloliquefaciens*, (D) planta de tomate con *B. pseudomycooides*, (E) planta de tomate con *B. velezensis*, (F) planta de tomate con control

positivo, (G) planta de tomate sin inocular. (H) planta de chile con *B. cereus* identificado como el aislado S3-3; (I) planta de chile con *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, (J) planta de chile *B. amyloliquefaciens*, (K) planta de chile con *B. pseudomycoides*, (L) planta de chile con *B. velezensis*, (M) planta de chile con control positivo, (N) planta de chile sin inocular. (O) planta de berenjena con *B. cereus* identificado como el aislado S3-3; (P) planta de berenjena con *B. cereus* identificado como el aislado S1-3, (Q) planta de berenjena con *B. amyloliquefaciens*, (R) planta de berenjena con *B. pseudomycoides*, (S) planta de berenjena con *B. velezensis*, (T) planta de berenjena con control positivo, (U) planta de berenjena sin inocular.

En la presente investigación se demostró la actividad antagonista contra *Sclerotium rolfsii* y de promoción de crecimiento en plantas de tomate, berenjena y chile por parte de *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis*. El género *Bacillus* es ampliamente estudiado debido a su alta abundancia y diversidad en los agrosistemas (suelo, agua y planta), siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Las especies de *Bacillus* tienen características especiales que las convierten en buenos candidatos como agentes de control biológico. Primero, en general estas bacterias representan una fuente nueva y rica de metabolitos secundarios que deben explorarse, estos metabolitos secundarios exhiben fuertes actividades antifúngicas y antibacterianas que permiten que la bacteria sobreviva en su entorno natural (Sansinenea y Ortiz, 2011). En segundo lugar, tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas mediante la fijación de nitrógeno y solubilización de nutrientes (Fe, K, P y Zn), producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico), producción de sideróforos y ácidos orgánicos, inducción de la resistencia sistémica, entre otros mecanismos (Roriz et al., 2020; Villarreal-Delgado et al., 2018). Tercero, las bacterias del género *Bacillus* son de gran interés debido no solo a su capacidad biocontroladora y de promoción de crecimiento; sino por presentar la ventaja sobre otros géneros bacterianos estudiados, de formar esporas, mismas que le permiten crecer y sobrevivir bajo condiciones adversas, como el calor y la desecación, algo que las hace un candidato ideal para la formulación de productos biotecnológicos y su posible aplicación a gran escala (Keswani et al., 2019; Kumar et al., 2020; Villarreal-Delgado et al., 2018).

Una de las características más importantes del género *Bacillus* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales son los más estudiados y la actividad antimicrobiana de estos lipopéptidos tiene lugar por su interacción con la

membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos, alterando procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento del ARN (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Las especies de *Bacillus* encontradas en la presente investigación fueron estudiadas y reportadas por su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, así como para promover el crecimiento de los cultivos. Tal es el caso de *B. cereus*, la cual se considera como la única especie de *Bacillus* productora del antibiótico zwittermicina A (ZmA); este antibiótico tiene diversas actividades biológicas, como la supresión de enfermedades en plantas causadas por protistas, la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias (Gram positivas y Gram negativas), así como la amplificación de la actividad insecticida de la proteína toxina de *B. thuringiensis* (Kevany et al., 2009; Sansinenea y Ortiz, 2011). También, se le atribuye la inhibición de los hongos fitopatógenos, incluyendo a *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, y *Fusarium solani* (Kushwaha et al., 2019) debido a la producción de los lipopéptidos antifúngicos surfactina A, iturina D y bacilomicina C (Kumar et al., 2020; Torres et al., 2017). Por otro lado, *B. cereus* ha mostrado cualidades de promoción de crecimiento como fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, ácido indolacético, ácido giberélico, amoniaco, catalasa, actividad ACC desaminasa y capacidad de fijación de nitrógeno promoviendo el crecimiento en plantas de tomate mediante la inoculación de las semillas (Govindasamy et al., 2017; Karthika et al., 2020).

Respecto a *B. amyloliquefaciens*, se ha reportado la presencia de genes con capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en el genoma de esta bacteria, como las síntesis no ribosómicas de policétidos (bacilano, difcidina y macrolactina), y lipopéptidos (surfactina, iturina, fengicina, bacilomicina y bacilisina) (Zaccardelli et al., 2020) y sideróforos (bacilibactina) (Liu et al., 2011; Scholz et al., 2011). Además, la iturina A purificada de *B. amyloliquefaciens* induce un aumento de la permeabilidad de la membrana celular y del contenido de MDA (marcador del estrés oxidativo) y una disminución del contenido de proteínas en células de *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro* (Yan et al., 2020). En cuanto a su capacidad promotora de crecimiento, *B. amyloliquefaciens* es capaz de transformar la forma insoluble de nutrientes (P, Zn y K) en forma soluble (Kushwaha et al., 2019), reducir nitratos, producir ácido indolacético y sideróforos (Kumar et al., 2020). La producción de ácido indolacético afecta la raíz de la planta al aumentar su tamaño, peso y número de ramas, así como el área de

superficie en contacto con el suelo lo que ayuda en la absorción de nutrientes, mejorando la nutrición de las plantas y la capacidad de crecimiento (Chinakwe et al., 2019).

Por otro lado, se ha probado la capacidad de inhibir a *S. rolfii* por parte de *B. velezensis*, cuya eficacia en el biocontrol de este patógeno alcanzó de 62.6–70.8%, y se infirió que el daño a la integridad de la membrana de las hifas de *S. rolfii* podría ser el posible modo de acción de esta especie de *Bacillus* (Chen et al., 2019). Asimismo, Li et al. (2019), Xu et al. (2020) y Yang et al. (2020) demostraron, que la cepa CPA1-1 de *B. velezensis* porta genes que codifican para la biosíntesis de varios compuestos antimicrobianos, como los lipopéptidos surfactina, iturina, fengicina, bacilibactina y bacilomicina D, y los policétidos macrolactina, bacilano y difcidina. También, *B. velezensis* muestra una apreciable solubilización de fósforo y zinc, producción de compuestos orgánicos volátiles, ácido indolacético, citoquinina, cianuro de hidrógeno, amoníaco y sideróforos (Kloepper y Schroth, 1981; Ramavath et al., 2019; Xu et al., 2020).

Hasta el momento, existe poca información referente a la capacidad de biocontrol de *B. pseudomycoides*, no obstante, se sabe que las bacterias miembros del grupo de *B. cereus* al cual pertenece, tienen la capacidad de producir bacilibactina (Keswani et al., 2019). En un estudio realizado por Tsegaye et al. (2019), *B. pseudomycoides* fue positiva para la producción de proteasa y celulasa, las cuales son enzimas responsables de la degradación de los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos (Villarreal-Delgado et al., 2018). Del mismo modo se han reportado resultados positivos para la producción de ácidos orgánicos (aumento de la biodisponibilidad de fósforo) y producción de ácido indolacético por parte de esta bacteria (Tsegaye et al., 2019).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que estas rizobacterias poseen múltiples atributos que promueven el crecimiento de las plantas que se pueden aplicar como biofertilizantes o como agentes de biocontrol en la agricultura, para mejorar el crecimiento y la productividad de las plantas (Chinakwe et al., 2019). Además, existen diversas estrategias, como la mejora de la cepa, la optimización del medio, el diseño de biorreactores o el uso de desechos agroindustriales para la fermentación para reducir el costo de la materia prima, para lograr una producción mejorada de biosurfactantes (Sansinenea y Ortiz, 2011).

7. CONCLUSIONES

En la presente investigación fue posible el aislamiento e identificación de cuatro especies bacterianas del género *Bacillus*: *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y *B. pseudomycooides*. Además, se demostró su capacidad antagonista contra el hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* en condiciones *in vitro* e *in vivo*, así como su capacidad para promover el crecimiento en plantas de tomate, berenjena y chile. Entre los cultivos evaluados, el tomate fue el que mostró la mejor respuesta a la inoculación con las cepas de *Bacillus* spp.

En general, la cepa de *B. pseudomycooides* presentó la mejor capacidad de biocontrol (*in vitro* e *in vivo*) y de promoción de crecimiento en los cultivos evaluados. Respecto a esta especie de *Bacillus*, existe poca información sobre su capacidad antagonista y de promoción de crecimiento, por lo que se considera conveniente enfocar los esfuerzos y nuevas líneas de investigación en esta dirección.

8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda continuar con esta investigación a detalle, utilizando la cepa de *B. pseudomycoides*, debido a los buenos resultados que presentó en laboratorio e invernadero.

Dentro de las líneas de investigación posibles se sugieren la identificación y caracterización de los compuestos antimicrobianos y de promoción de crecimiento producidos por la cepa mencionada. Evaluar la formulación de productos agrobiológicos a base de esporas o bien, desarrollar un método de extracción de los compuestos antimicrobianos y de promoción de crecimiento a fin de elaborar formulados con los compuestos de interés, para su aplicación en campo.

9. REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology* (Elsevier Ed. 5th Edition ed.). San Diego.
- Bhattacharyya, P. N., yJha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4):1327-1350.
- Chen, L., Wu, Y., Chong, X., Xin, Q., Wang, D., yKe, b. (2019). Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Applied Microbiology*, 128:803-813.
- Chinakwe, E. C., Ibekwe, V. I., Nwogwugwu, U. N., Ofoegbu, J., Mike-Anosike, E., Nwachukwu, I. N., Adeleye, S., yChinakwe, P. O. (2019). Evaluation of plant growth promoting potentials exhibited by rhizobacteria associated with beans plant. *Malaysian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(1):20-22.
- Dinu, S., Petrișor, C., yConstantinescu, F. (2018). Evaluation methods of antagonistic microorganisms, natural resources of ecosystems—minireview. *Romanian Journal for Plant Protection*, 11:66-81.
- Dwivedi, S., yPrasad, G. (2016). Integrated management of *Sclerotium rolfsii*: an overview. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 3(11):137-146.
- González-Lavaut, J. A., Montes de Oca-Rojas, Y., yDomínguez-Mesa, M. I. (2007). Breve reseña de la especie *Solanum melongena* L. . *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 12.
- González, A. (2013). *Sclerotium rolfsii*, un patógeno de judía que produce daños de forma ocasional. *Tecnología Agroalimentaria*:19-20.
- Gouda, S., Kerry, R., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H., yPatra, J. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206:131-140.
- Govindasamy, V., Raina, S., George, P., Kumar, M., Rane, J., Minhas, P., yVittal, K. (2017). Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(7):925-943.
- He, D., Zhan, J., yXie, L. (2016). Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(4):705-715.
- Karthika, S., Midhun, S., yJisha, M. S. (2020). A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microbial Pathogenesis*, 142:104049.
- Keswani, C., Singh, H., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y., Mezaache-Aichour, S., Glare, T., Borriș, R., ySansinenea, E. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *Applied Microbiology Biotechnology*:1-22.
- Kevany, B. M., Rasko, D. A., yThomas, M. G. (2009). Characterization of the complete zwittermicin A biosynthesis gene cluster from *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental*

Microbiology, 75(4):1144-1155.

- Kloepper, J. W., ySchroth, M. N. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 71(10):1020-1024.
- Kumar, V., Jain, L., Jain, S., Chaturvedi, S., yKaushal, P. (2020). Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. *South African Journal of Botany*, 00:1-14.
- Kushwaha, P., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., yTiwari, R. K. (2019). Plant growth promoting and antifungal activity in endophytic *Bacillus* strains from pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Brazilian Journal of Microbiology*:1-13.
- Ley-López, N., Márquez-Zequera, I., Carrillo-Fasio, J. A., León-Félix, J., Cruz-Lachica, I., García-Estrada, R. S., yAllende-Molar, R. (2018). Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2):215-232.
- Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X., Wu, H., Liu, W., yGao, X. (2011). Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 20(1):43-52.
- Mahadevakumar, S., Yadav, V., Tejaswini, G. S., yJanardhana, G. R. (2016). Morphological and molecular characterization of *Sclerotium rolfsii* associated with fruit rot of *Cucurbita maxima*. *European Journal of Plant Pathology*, 145(1):215-219.
- Mejía-Bautista, M. A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., yReyes-Ramírez, A. (2016). Actividad in vitro de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*, 50(8):1123-1135.
- Mustafa, S., Kabir, S., Shabbir, U., yBatool, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. *Symbiosis*, 78(2):115-123.
- Paredes-Escalante, J. E., Carrillo-Fasio, J. A., García-Estrada, R. S., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J. A., yValdez-Torres, J. B. (2009). Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1):27-35.
- Paul, N., Hwang, E., Nam, S., Lee, H., Lee, J., Yu, G., Kang, Y., Lee, K., Go, S., yYang, J. (2017). Phylogenetic placement and morphological characterization of *Sclerotium rolfsii* (Teleomorph: *Athelia rolfsii*) associated with blight disease of *Ipomoea batatas* in Korea. *Mycobiology*, 45(3):129-138.
- Pérez-Acevedo, C. E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Chávez-Servia, J. L., Perales-Segovia, C., Enríquez del Valle, R., yVillegas-Aparicio, Y. (2017). Diagnóstico de síntomas y patógenos asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8:281-293.
- Rakh, R. R., Raut, L. S., Dalvi, S. M., yManwar, A. V. (2011). Biological control of *Sclerotium rolfsii*, causing stem rot of groundnut by *Pseudomonas cf. monteilii* 9. *Recent Research in Science Technology*, 3(3):26-34.

- Ramavath, K., Hameeda, B., yReddy, G. (2019). Enhancement of plant growth in tomato by inoculation with plant growth promoting *Bacillus* spp. *World Journal of Agricultural Research*, 7(2):69-75.
- Remesal-González, E. (2012). Diversidad genética y patogénica de *Sclerotium rofsii* Sacc. como factor determinante de epidemias de podredumbre de raíces. (Tesis Doctoral), Universidad de Córdoba, Colombia.
- Ríos-Velasco, C., Caro-Cisneros, J. M., Berlanga-Reyes, D. I., Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Salas-Marina, M. A., Villalobos-Pérez, E., yGuerrero-Prieto, V. M. (2016). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1):84-99.
- Roriz, M., Carvalho, S., Castro, P., yVasconcelos, M. (2020). Legume biofortification and the role of plant growth-promoting bacteria in a sustainable agricultural era. *Agronomy*, 10(3):435.
- Sahni, S., Prasad, B., yRanjan, T. (2019). Biocontrol of *Sclerotium rofsii* using antagonistic activities of Pseudomonads. *Current Journal of Applied Science Technology*, 35:1-9.
- Sahu, P., Singh, S., Gupta, A., Singh, U., Brahmaprakash, G., ySaxena, A. (2019). Antagonistic potential of bacterial endophytes and induction of systemic resistance against collar rot pathogen *Sclerotium rofsii* in tomato. *Biological Control*, 137:104014.
- Sansinenea, E., yOrtiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8):1523-1538.
- Schaad, N., Jones, J., yChun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*: American Phytopathological Society (APS Press).
- Scholz, R., Molohon, K., Nachtigall, J., Vater, J., Markley, A., Süssmuth, R., Mitchell, D., yBorriß, R. (2011). Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 193(1):215-224.
- Sindhu, S., Sehrawat, A., Sharma, R., yDahiya, A. (2016). Biopesticides: use of rhizosphere bacteria for biological control of plant pathogens. *Defence Life Science Journal*, 1:135-148.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., yHeydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3):131-138.
- Torres, M. J., Brandan, C., Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., yAudisio, M. C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) pathogens. *Biological Control*, 105:93-99.
- Tsegaye, Z., Gizaw, B., Tefera, G., Feleke, A., Chaniyalew, S., Alemu, T., yAssefa, F. (2019). Isolation and biochemical characterization of Plant Growth Promoting (PGP) bacteria colonizing the rhizosphere of Tef crop during the seedling stage. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 14(2):1586-1597.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., yde los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1):95-130.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., yLane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA

amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2):697-703.

Xu, S., Xie, X., Zhao, Y., Shi, Y., Chai, A., Li, L., yLi, B. (2020). Whole-genome analysis of *Bacillus velezensis* ZF2, a biocontrol agent that protects *Cucumis sativus* against *Corynespora* leaf spot diseases. *Biotech*, 10(4):186.

Yan, F., Li, C., Ye, X., Lian, Y., Wu, Y., yWang, X. (2020). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* MG3 against *Colletotrichum gloeosporioides* in loquat fruits. *Biological Control*, 20:104281.

Yanti, Y., Hamid, H., yHabazar, T. (2020). The ability of indigenous *Bacillus* spp. consortia to control the anthracnose disease (*Colletotrichum capsici*) and increase the growth of chili plants. *Journal of Biological Diversity*, 21(1):179-186.

Zaccardelli, M., Sorrentino, R., Caputo, M., Scotti, R., De Falco, E., yPane, C. (2020). Stepwise-Selected *Bacillus Amyloliuefaciens* and *B. Subtilis* Strains from Composted Aromatic Plant Waste Able to Control Soil-Borne Diseases. *Agriculture*, 10(2):30.