



Revista Mexicana de Fitopatología

ISSN: 0185-3309

revmexfitopatologia@gmail.com

Sociedad Mexicana de Fitopatología,
A.C.
México

Rios Velasco, Claudio; Caro Cisneros, Janeth M.; Berlanga Reyes, David I.; Ruiz Cisneros, María F.; Ornelas Paz, José J.; Salas Marina, Miguel Á.; Villalobos Pérez, Elizabeth; Guerrero Prieto, Víctor M.
Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi
Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 34, núm. 1, 2016, pp. 84-99
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.
Texcoco, México

Available in: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612432050005>

- How to cite
- Complete issue
- More information about this article
- Journal's homepage in redalyc.org

redalyc.org

Scientific Information System

Network of Scientific Journals from Latin America, the Caribbean, Spain and Portugal

Non-profit academic project, developed under the open access initiative

Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi

Identificación y actividad antagónica *in vitro* de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes

Claudio Rios Velasco*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Janeth M. Caro Cisneros**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, *Campus* Cuauhtémoc, Av. Presa de la Amistad 2015. Barrio de la Presa, C.P. 31510. Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **David I. Berlanga Reyes**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **María F. Ruiz Cisneros** Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial Cuauhtémoc, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **José J. Ornelas Paz**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua. Av. Río Conchos S/N. Parque Industrial, C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Miguel Á. Salas Marina**, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV, *Campus* Irapuato) del Instituto Politécnico Nacional, Km. 9.6 Libramiento Norte, C.P. 36821, Irapuato Guanajuato, México; **Elizabeth Villalobos Pérez**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, *Campus* Cuauhtémoc, Av. Presa de la Amistad 2015. Barrio de la Presa, C.P. 31510. Cuauhtémoc, Chihuahua, México; **Víctor M. Guerrero Prieto**, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, *Campus* Cuauhtémoc, Av. Presa de la Amistad 2015. Barrio de la Presa, C.P. 31510. Cuauhtémoc, Chihuahua, México. *Corresponding author: claudio.rios@ciad.mx

Recibido: 1 de Julio, 2015.

Aceptado: 17 de Noviembre, 2015.

Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E y Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 84-99.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1507-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1)

Primera publicación DOI: 26 de Noviembre, 2015.

First DOI published: November 26, 2015.

Abstract. Several diseases in crop plants caused by pathogenic fungi represent an economic

Resumen. Muchas enfermedades en cultivos causadas por hongos patógenos representan un problema económico debido a las pérdidas que éstas causan. Del mismo modo microorganismos antagonistas tales como *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., entre otros, han sido usados como agentes de control biológico como una alternativa eficiente para reducir el uso de fungicidas químicos en el control de enfermedades de plantas. El objetivo de este estudio fue identificar taxones de microorganismos patógenos y antagonistas basado en sus caracteres moleculares y evaluar la actividad antagónica *in vitro* de dos aislados de *Bacillus* y dos aislados

problem due the losses they cause. Likewise, antagonistic microorganisms have been used as biological control agents such as *Trichoderma* spp. and *Bacillus* spp., among others as an efficient alternative to reduce the use of chemical fungicides in the control of crop diseases. The aim of this study was to identify the taxa of pathogens and antagonists microorganisms based on their molecular characters and to evaluate the antagonistic activity *in vitro* of two *Bacillus* isolates and two *Trichoderma* isolates, against five common pathogenic fungi: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus nidulans*, and *Alternaria alternata*. The nine microorganisms were used for the gDNA extraction and to amplify the 18S ribosomal DNA gene and the Internal Transcribed Spacer with the ITS primers ITS5 and ITS4 of fungi and gene of the 16S of the rDNA, using the universal primers EU(F) and EU(R) for bacteria, for molecular identification. Both *T. asperellum* isolates showed a significant antagonistic activity against the phytopathogenic fungi tested where the percentage of radial growth inhibition (PRGI) of the fungi colonies ranged from 43 to 71 %, whereas the PRGI induced by *Bacillus* species, were significant, with values up to 69 % when tested *in vitro* against *B. cinerea*, while the lowest effect was observed with *F. oxysporum*, *P. crustosum*, and *A. nidulans*. Both *Bacillus* species induced the presence of an inhibition halo, with values of 5 and 11 mm, when tested *in vitro* against *F. oxysporum*, and *B. cinerea*, respectively. The antagonistic effect of the bacterial and fungal isolates showed that these microorganisms could be used as biological control agents of several phytopathogenic fungi of crop plants.

Key words: *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma asperellum*, phytopathogens, ITS region, molecular identification.

de *Trichoderma* contra cinco hongos patógenos comunes: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus nidulans* y *Alternaria alternata*. Para la identificación molecular, los nueve microorganismos fueron usados para la extracción del ADN genómico y amplificación del gen del ADN ribosomal 18S y del Espaciador Transcrito Interno con los iniciadores ITS (ITS5 e ITS4) para los hongos y el gen del 16S del ADNr, usando los iniciadores universales EU(F) y EU(R) para bacterias. Ambos aislados de *T. asperellum* mostraron una actividad antagonista significativa contra los hongos fitopatógenos probados, donde los porcentajes de inhibición del crecimiento radial (PICR) de las colonias de hongos fitopatógenos fluctuó de 43 a 71 %, mientras los PICR inducidos por *Bacillus* fueron significativos, con valores de hasta 69 % cuando se probaron *in vitro* contra *B. cinerea*, mientras que el efecto más bajo se observó con *F. oxysporum*, *P. crustosum* y *A. nidulans*. Ambas especies de *Bacillus*, indujeron la presencia de un halo de inhibición, con valores de 5 y 11 mm, cuando se probaron *in vitro* contra *F. oxysporum* y *B. cinerea*, respectivamente. Los efectos antagonistas de los aislados de bacterias y hongos, muestran que estos microorganismos pueden ser usados como agentes de control biológico de varios hongos fitopatógenos de cultivos.

Palabras clave: *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Trichoderma asperellum*, fitopatógenos, región ITS, identificación molecular.

Una gran diversidad de microorganismos patógenos tales como Oomicetos, hongos, bacterias, nematodos, entre otros, pueden causar enfermedades en cultivos, siendo un serio problema ocasionando pérdidas económicas en todo el mundo. Por consiguiente, los problemas y limitaciones del control de enfermedades en plantas, ha sido manejado mediante el uso de plaguicidas químicos.

A great diversity of pathogenic microorganisms such as Oomycetes, fungi, bacteria, nematodes, among others, can cause diseases in crop plants, being a serious problem causing economic losses worldwide. Therefore, the problems and limitations of the control of plant diseases have been handled by using chemical pesticides. Furthermore, its inappropriate use has been linked to several problems such as environmental pollution, food residues, intoxication risk when they are managed without adequate protection equipment, also resistant development of pathogens to the synthetic fungicides and the loss of the natural biodiversity in agroecosystems (Harris *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2012). This problematic has conducted to the search of new alternatives for managing plant diseases that are ecologically and economically viable, with minimal impact on the environment.

An alternative to chemical control of phytopathogenic fungi is its suppression by use of biological control agents with emphasis in the use of native antagonists (Zeilinger and Omann, 2007; Vinale *et al.*, 2008), being a tool that does not affect the environment. Consideration has been given to the possibility of controlling pathogens by the use of several microorganisms with antagonistic activity such as fungi, bacteria, and actinomycetes. However, the first two have been the most used, mainly *Trichoderma* and *Bacillus* genera. The most used bacteria specie has been *B. subtilis*, however there are other antagonist species such as *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens* which have been poorly studied, but have been considered as efficient colonizers that are widely spread in different habitats, due to its capacity to form spores, grow in a wide range of temperatures, antibiotic production that inhibit the growth of phytopathogens, besides being plant growth promoters (Leelasuphakul *et al.*, 2008). Both,

Además, su uso inapropiado se ha relacionado con varios problemas tales como contaminación ambiental, residuos en alimentos, también el desarrollo de resistencia a los fungicidas sintéticos por los patógenos y la pérdida de la biodiversidad natural en los agroecosistemas (Harris *et al.*, 2001; Fisher *et al.*, 2012). Ésta problemática ha conducido a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de enfermedades de plantas que sean ecológica y económicamente viables, con un impacto mínimo en el ambiente.

Una alternativa al control químico de hongos fitopatogénicos es su supresión por el uso de agentes de control biológico con énfasis en el uso de antagonistas nativos (Zeilinger and Omann, 2007; Vinale *et al.*, 2008), siendo una herramienta que no afecta al ambiente. Se ha considerado la posibilidad de controlar patógenos por el uso de varios microorganismos con actividad antagónica tales como hongos, bacterias y actinomicetos. Sin embargo, los dos primeros han sido los más usados, principalmente los géneros *Trichoderma* y *Bacillus*. *Bacillus subtilis* ha sido la especie de bacterias más usada, sin embargo, existen otras especies de antagonistas tales como *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*, las cuales han sido pobremente estudiadas, pero han sido consideradas como colonizadores eficientes que se diseminan ampliamente en diferentes hábitats, debido a su capacidad de formar esporas, su crecimiento en un amplio rango de temperaturas, producción de antibióticos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, además de ser promotores del crecimiento vegetal (Leelasuphakul *et al.*, 2008). Ambos antagonistas, hongos y bacterias, constituyen la mayoría de la población microbiana en el suelo, que ha sido el principal reservorio natural, donde el equilibrio entre la diversidad de microorganismos es dinámico, contribuyendo en la reducción de enfermedades en plantas cultivadas y no cultivadas (Gajera and Vakharia,

antagonistic fungi and bacteria, constitute the majority of the microbial population in soil that is the main natural reservoir, where the equilibrium between the diversity of microorganism is dynamic, contributing in reducing diseases in crop plants and uncultivated plants (Gajera and Vakharia, 2010; Singh and Islam, 2010). This ecological balance is supported by different complex interactions to inhibit the growth of phytopathogenic fungi through several modes of action such as: direct competition for nutrients and space, direct mycoparasitism, production of antibiotics by the excretion of toxic compounds like cytokinins and auxins, inactivation of pathogenic enzymes, also can be compatible with management practices, including the use of pesticides, production of organic and inorganic volatile compounds. Besides its fast growth, are easily adaptable, induces systemic resistance in host plants to pathogens, and contributes to a better assimilation of nutrients (Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008; Arguelles, 2009; Correa *et al.*, 2009). However, antagonistic microorganisms populations have been reduced by anthropogenic activities, especially by chemical pesticides used in the crops management (Gajera and Vakharia, 2010). Microbial control agents are commonly used for the management of bacterial and fungal diseases in crops and it is becoming more widely used, with a possible reduction in the use of synthetic pesticides. These microbial agents are generally identified based on their microscopic morphological characters. Although microorganisms can be identified based on morphologic characters, molecular techniques are nowadays widely used and in general more acceptable tools for identification that offer quick and reliable information for the study of identity (Gajera and Vakharia, 2010). Therefore the aims of this study were to identify taxa and to evaluate the antagonistic activity *in vitro* of two *Bacillus* isolates and two *Trichoderma asperellum* isolates,

2010; Singh and Islam, 2010). Este balance ecológico esta apoyado por diferentes interacciones complejas para inhibir el crecimiento de hongos fitopatogénicos a través de varios modos de acción tales como: competencia directa por nutrientes y espacio, micoparasitismo directo, producción de antibióticos por la excreción de compuestos tóxicos como citoquininas y auxinas, inactivación de enzimas patógenicas, además pueden ser compatibles con las prácticas de manejo, incluyendo el uso de plaguicidas, producción de compuestos volátiles orgánicos e inorgánicos. Además de su rápido crecimiento, son fácilmente adaptables, inducen resistencia sistémica en las plantas hospederas hacia los patógenos y contribuyen a una mejor asimilación de nutrientes (Ezziyyani *et al.*, 2004; Harman, 2006; Leelasuphakul *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008; Arguelles, 2009; Correa *et al.*, 2009). Sin embargo, las poblaciones de microorganismos antagonistas han sido reducidas por actividades antropogénicas, especialmente por los plaguicidas químicos usados en el manejo de cultivos (Gajera and Vakharia, 2010). Los agentes de control microbiano se utilizan comúnmente para el manejo de enfermedades bacterianas y fúngicas en cultivos y estos han comenzado a ser ampliamente utilizados, con una posible reducción en el uso de plaguicidas sintéticos. Estos agentes microbianos son identificados generalmente basado en sus caracteres morfológicos microscópicos. Aunque los microorganismos pueden ser identificados basados en sus caracteres morfológicos, las técnicas moleculares son hoy en día las más ampliamente utilizadas y en general son herramientas más aceptadas para la identificación que ofrecen información rápida y fiable para el estudio de identidad (Gajera and Vakharia, 2010). Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron identificar los taxones y evaluar la actividad antagónica *in vitro* de dos aislados de

against five common pathogenic fungi.

Experimental site and biological samples.

The experiment was performed *in vitro*, in the Laboratory of Patología Vegetal y Control Biológico of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Microorganisms used, were obtained from the microorganisms ceparium of the same *Campus*. Pathogens were isolated from fruits, diseased tissue of apple trees and soil samples near to rhizosphere, collected from different apple orchards and geographic regions of Chihuahua, México, in different periods. Also antagonists were obtained from soil samples near to rhizosphere of apple trees in the same geographic regions and were selected by their antagonistic capacity *in vitro* against Oomycetes (Rios-Velasco *et al.*, 2014). The fungi were active into potato-dextrose-agar (PDA, Bioxon™ Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) and incubated at 26 °C in an environmental chamber (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, VA, USA) for 5-10 d.

Morphological and molecular identification.

Nine microorganisms: five phytopathogenic fungi, two antagonistic fungi and two antagonistic bacteria isolates, used in this study were identified to genus with the help of taxonomic keys according to their morphological characters as viewed by an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) (Dugan, 2006; Watanabe, 2010). Subsequently, were molecularly identified in the Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV, *Campus* Irapuato, Guanajuato, México.

To identify the fungal isolates based on their molecular characters, their genomic DNA (gDNA) was extracted. Thus, an explant of each purified fungus was placed and cultured in a Petri dish with

Bacillus y dos aislados de *Trichoderma asperellum*, contra cinco hongos fitopatogénicos comunes.

Sitio experimental y muestras biológicas.

El experimento se realizó *in vitro*, en el Laboratorio de Patología Vegetal y Control Biológico del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., *Campus* Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Los microorganismos utilizados, se obtuvieron del cepario de microorganismos del mismo *Campus*. Los patógenos se aislaron de frutos y tejido enfermo de árboles de manzano y de muestras de suelo cercano a la rizosfera, recolectados de diferentes huertos de manzano y regiones geográficas de Chihuahua, México, en diferentes periodos. Así mismo, los antagonistas se obtuvieron de muestras de suelo cercano a la rizosfera de árboles de manzano en las mismas regiones geográficas y fueron seleccionados por su capacidad antagónica *in vitro* contra Oomicetos (Rios-Velasco *et al.*, 2014). Los hongos fueron activados en papa-dextrosa-agar (PDA, Bioxon^{MR} Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) e incubados a 26 °C en una cámara ambiental (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, VA, USA), por 5-10 d.

Identificación morfológica y molecular.

Nueve microorganismos: cinco aislados de hongos fitopatogénicos, dos de hongos antagonistas y dos de bacterias antagonistas, usados en este estudio, fueron identificados hasta género con la ayuda de claves taxonómicas, de acuerdo a sus caracteres morfológicos, así como observados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Germany) (Dugan, 2006; Watanabe, 2010). Subsecuentemente, fueron identificados molecularmente en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, CINVESTAV, *Campus* Irapuato, Guanajuato, México.

PDA covered with a sterile cellophane to facilitate the collection of the fungal biomass and incubated at 26 °C for 7 d. Mycelium was collected in a porcelain mortar together with a buffer [200 mM Tris-HCl at pH = 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] for gDNA extraction filamentous fungi at 70 °C, frozen with liquid nitrogen and macerated following the protocol described by Raeder and Broda (1985). The gDNA obtained from fungi was examined by electrophoresis in an 1 % agarose gel, which was used to amplify the 18S rDNA gene and the Internal Transcribed Spacer (ITS), using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') where the expected fragments were about 600 to 710 bp (White *et al.*, 1990). The amplification conditions were divided into various steps: an initial step of denaturalization at 94 °C for 5 min, a second step comprising 30 cycles including denaturalization at 94 °C of 30 s, an alignment step at 60 °C for 30 s, a step of extension at 72 °C for 45 s, and when the cycles were completed, a final extension at 72 °C for 10 min.

For the antagonistic bacteria, an explant of the purified colony of 72 h growth was taken for the gDNA extraction described by Heddi *et al.* (1999). The gDNA obtained was examined by electrophoresis in an 1 % agarose gel, which was used to amplify the gene of the 16S of the rDNA by PCR, using the universal primers EU(F) (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and EU(R) (5'-TACCTTGTACGACTTCACC-3'). The amplification conditions were divided into various steps: an initial of denaturalization at 94 °C for 5 min, a second step comprising 35 cycles including denaturalization at 94 °C for 30 s, an alignment step at 53 °C for 45 s, a step of extension at 72 °C for 45 s, and when the cycles were completed, a final extension at 72 °C for 10 min (Heddi *et al.*, 1999).

Para identificar los aislados de hongos por sus caracteres moleculares, se extrajo su ADN genómico (ADNg). Por lo tanto, un explante de cada hongo purificado se colocó y cultivó en una caja de Petri con PDA cubierto con celofán estéril para facilitar la recolecta de la biomasa fúngica e incubado a 26 °C por 7 d. El micelio se recolectó en un mortero de porcelana, junto con un amortiguador [200 mM Tris-HCl a pH = 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS] para la extracción de ADNg de hongos filamentosos a 70 °C, congelado con nitrógeno líquido y macerado, siguiendo el protocolo descrito por Raeder and Broda (1985). El ADNg obtenido de los hongos, fue examinado por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, el cual se utilizó para amplificar el gen 18S del ADN ribosomal (ADNr) y el Espaciador Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés), usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), donde los fragmentos esperados fueron de aproximadamente 600 a 710 pb (White *et al.*, 1990). Las condiciones de amplificación fueron divididas en varios pasos: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, un segundo paso comprendiendo 30 ciclos, incluyendo una desnaturalización a 94 °C por 30 s, un paso de alineamiento a 60 °C por 30 s, un paso de extensión a 72 °C por 45 s y cuando se completaron los ciclos, una extensión final a 72 °C por 10 min.

Para las bacterias antagonistas, se tomó un explante de la colonia purificada de 72 h de crecimiento, para la extracción del ADNg descrita por Heddi *et al.* (1999). El ADNg obtenido, se examinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, el cual se utilizó para amplificar el gen del 16S del ADNr por PCR, usando los iniciadores universales EU(F) (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y EU(R) (5'-TACCTTGTACGACTTCACC-3'). Las condiciones de amplificación se dividieron en

The PCR products of both microorganisms' taxa were examined by electrophoresis in an 1 % agarose gel. Subsequently, were sequenced by the company Macrogen (Rockville, Maryland, USA). Sequences obtained were compared against the NCBI database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to verify the percent identity and they corresponded to the identified species. The nucleotide sequences obtained, have not been deposited in the NCBI.

Inoculum preparation.

The inoculum was prepared by a suspension of fungal spores and bacteria, respectively, in sterile peptone-water containing sodium chloride at 0.85 % and peptone at 0.1 % into 2 mL micro tubes. The concentration of spores was estimated using a Neubauer chamber (Neubauer Improved bright-line, Marienfield, Germany) and bacteria were quantified by technique of serial dilutions and plate colony count. Both suspensions were stored at 0 °C until use. The concentration of the suspensions where the filter paper circles were immerse for the evaluation of antagonistic activity *in vitro*, ranged from 1.0×10^7 to 9.5×10^7 fungi spores or CFU-bacteria per milliliter.

***In vitro* evaluation of antagonism.**

In vitro confrontations of *T. asperellum* against pathogenic fungi were performed using the dual culture technique (Petri dishes, 90×15 mm) with PDA, that consisted in placing in one side of the dish a filter paper circle of 6 mm in diameter, impregnated with a suspension of conidia and mycelium as the inoculum of pathogens and in the opposite side of the Petri dish, another filter paper circle with mycelium and/or conidia of the antagonist was placed. Ten replicates for each evaluation were performed by triplicate. Also ten controls (Petri dishes) by triplicate were considered, both phytopathogens as antagonists, grown

various pasos: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, un segundo paso comprendiendo 35 ciclos incluyendo una desnaturalización a 94 °C por 30 s, un paso de alineamiento a 53 °C por 45 s, un paso de extensión a 72 °C por 45 s y cuando los ciclos se completaron, una extensión final a 72 °C por 10 min (Heddi *et al.*, 1999).

Los productos de PCR de ambos taxones de microorganismos, se examinaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Subsecuentemente, fueron secuenciados por la compañía Macrogen (Rockville, Maryland, EUA). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990), para verificar el porcentaje de identidad y que correspondieran a las especies identificadas. Las secuencias de nucleótidos obtenidas, no han sido depositadas en el NCBI.

Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó mediante una suspensión de esporas fúngicas y bacterias, respectivamente, en agua peptonada estéril que contenía cloruro de sodio al 0.85 % y peptona al 0.1 % en microtubos de 2 mL. La concentración de esporas se estimó usando una cámara de Neubauer (Neubauer Improved bright-line, Marienfield, Alemania) y las bacterias se cuantificaron por la técnica de diluciones seriadas y conteo de colonias en placa. Ambas suspensiones se almacenaron a 0 °C hasta su uso. La concentración de la suspensiones donde los círculos de papel filtro fueron sumergidas para la evaluación de la actividad antagónica *in vitro*, fluctuó de 1.0×10^7 a 9.5×10^7 esporas de hongos o UFC-bacteria por mililitro.

Evaluación del antagonismo *In vitro*.

Las confrontaciones *in vitro* de *T. asperellum* contra hongos fitopatogénicos, se realizaron usando la técnica de cultivo dual (cajas de Petri, 90

separately. Petri dishes inoculated were incubated at 28 °C for 15 d in an environmental chamber (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, USA). The radial growth of the fungal colonies was measured every 24 h for both microorganisms pathogens and antagonists. The inhibition halo, between phytopathogen and antagonist colonies in confrontation, was measured to the cardinal points of the Petri dish at 14 d post-incubation (Aquino-Martínez *et al.*, 2008).

The time when pathogen-antagonist colonies contacted, inhibition of radial growth of the colony, and type of antagonism according to Bell's scale (Bell *et al.*, 1982) were evaluated. Where the antagonistic activity was measured by five levels, being the level one of the scale when the antagonist overgrown completely the pathogen and fills the culture surface and the level five was when the pathogen overgrown completely to the antagonist and fills the culture surface.

The antagonism of *T. asperellum* was evaluated registering the following variables: radial growth of the antagonist (RGA), radial growth of the pathogen (RGP), and percentage of radial growth inhibition (PRGI). The PRGI was determined at sixth day post-inoculation using the formula proposed by Ezziyyani *et al.* (2004), $PRGI = [(R1 - R2) / R1] \times 100$, where R1 was the radial growth of the control colony (pathogen) and R2 was the radial growth of the pathogen colony in the *in vitro* confrontation.

In vitro confrontation of *Bacillus* species against pathogens were performed by placing one filter paper circle of 6 mm in diameter of pathogen in the center of Petri dish containing PDA, whereas the bacteria were inoculated on the cardinal points of the Petri dish, using filter paper circles of 6 mm in diameter with the inoculum. Ten replicates (Petri dishes) by triplicate were performed for each bacterium-fungus *in vitro* evaluation. Each of the

× 15 mm) con PDA, que consistió en colocar en un lado de la caja, un círculo de papel filtro de 6 mm de diámetro, impregnado con una suspensión de conidias y micelio del inóculo del patógeno y en el lado opuesto de la caja de Petri, se colocó otro círculo de papel filtro con el micelio y/o conidias del antagonista. Se realizaron diez repeticiones por triplicado para cada evaluación. También se consideraron diez testigos (cajas de Petri) por triplicado, tanto de los fitopatógenos como de los antagonistas, crecidos por separado. Las cajas de Petri inoculadas, se incubaron a 28 °C por 15 d en una cámara ambiental (Precision Scientific, Model 6LM, Winchester, EUA). El crecimiento radial de las colonias de hongos se midió cada 24 h para ambos microorganismos patógenos y antagonistas. El halo de inhibición, entre las colonias de fitopatógenos y antagonistas en confrontación, se midió hacia los puntos cardinales de la caja Petri a los 14 d post-incubación (Aquino-Martínez *et al.*, 2008).

Se evaluó el tiempo cuando las colonias patógeno-antagonista entraron en contacto, la inhibición del crecimiento radial de la colonia y el tipo de antagonismo de acuerdo con la escala de Bell (Bell *et al.*, 1982). Donde la actividad antagónica se midió en cinco niveles, siendo el nivel uno de la escala cuando el antagonista sobrecreció completamente al patógeno y llenó por completo la superficie del medio de cultivo, y el nivel cinco fue cuando el patógeno sobrecreció por completo al antagonista y llenó por completo la superficie del medio de cultivo. El antagonismo de *T. asperellum* se evaluó registrando las siguientes variables: crecimiento radial del antagonista (CRA), crecimiento radial del patógeno (CRP) y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). El PICR se determinó al sexto día de post-incubación usando la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004), $PRGI = [(R1 - R2) / R1] \times 100$, donde R1 fue el crecimiento radial de la colonia testigo (patógeno) y R2 el

control treatments of phytopathogenic fungi was cultured separately and incubated at 28 °C for 14 d. The radial growth of the pathogen in confrontation towards the antagonist colony was measured daily and in controls the radial growth from the center of the Petri dish toward the cardinal points was measured.

Statistical analysis.

Both bioassays were performed in triplicate, with ten Petri dishes per replicate, for each bacterium-fungus *in vitro* evaluation, using a completely randomized design, with five treatments: two antagonistic fungal isolates and two antagonistic bacteria isolates, confronted against five pathogens, besides 1 control, where each treatment was an antagonist microorganism with 30 Petri dishes (i.e., a total of 600). Data of PRGI and inhibition halo were analyzed using the Statistical Analysis System version 9.0 (SAS, 2002) for balanced analysis of variance (ANOVA) and means were separated by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Pathogens and antagonists identified.

The phytopathogens fungi identified morphologically and from the sequences of the PCR products were: *Fusarium oxysporum* strain LCF32, *Botrytis cinerea* strain G409, *Penicillium crustosum* strain 06CK005, *Aspergillus nidulans* strain UOA/HCPF, *Alternaria alternata* strain HMY 2-1, which had a 99-100 % of identity and a maximum similarity with the molecular scores and taxonomic keys excepting *P. crustosum*, that showed a 78 % of identity, corresponding to each strain and according to the sequences available in the GenBank database (NCBI), obtained by the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990). Also sequencing data showed that the fungal and bacterial antagonistic isolates identified were: *Trichoderma asperellum* TC1 strain LAHC-

crecimiento radial de la colonia del patógeno en la confrontación *in vitro*.

La confrontación *in vitro* de las especies de *Bacillus* contra patógenos se realizó colocando un círculo de papel filtro de 6 mm de diámetro del patógeno en el centro de la caja de Petri, que contenía PDA, mientras la bacteria se inoculó en los puntos cardinales de la caja de Petri, usando círculos de papel filtro de 6 mm de diámetro con el inóculo. Se realizaron diez repeticiones (cajas de Petri) por triplicado, para cada evaluación *in vitro* bacteria-hongo. Cada uno de los los tratamientos testigo de hongos fitopatógenos se sembraron por separado, e incubados a 28 °C por 14 d. Se midió diariamente, el crecimiento radial del patógeno en la confrontación, hacia la colonia del antagonista y en los testigos se midió el crecimiento radial desde el centro de la caja de Petri hacia los puntos cardinales.

Análisis estadístico.

Ambos bioensayos se realizaron por triplicado, con diez cajas de Petri por cada repetición, para cada evaluación *in vitro* de bacteria-hongo, usando un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos: dos aislados de hongos antagonistas y dos aislados de bacterias antagonistas, confrontados contra cinco patógenos, además de 1 control, donde cada tratamiento fue un microorganismo antagonista con 30 cajas de Petri (ej., un total de 600). Los datos del PICR y halo de inhibición se analizaron usando el Statistical Analysis System versión 9.0 (SAS, 2002), para el análisis de varianza (ANVA) y las medias fueron separadas usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Patógenos y antagonistas identificados.

Los hongos fitopatógenos identificados morfológicamente y de las secuencias de los productos de PCR fueron: *Fusarium oxysporum* cepa LCF32, *Botrytis cinerea* cepa G409, *Penicillium crustosum*

FFPK-M16- and *T. asperellum* TC2 strain BHU-BOT-RYRL16, *Bacillus methylotrophicus* strain IS04, *Bacillus amyloliquefaciens* strain Abk-2, had 99-100 % identity and maximum scores when compared with GenBank sequence, obtained from the BLAST algorithm NCBI database (Altschul *et al.*, 1990).

Antagonistic activity.

In vitro. Radial growth of the five phytopathogenic fungi tested, was significantly reduced when evaluated *in vitro* against *T. asperellum* TC1 and TC2, where both antagonists fungi showed a significant efficiency to inhibit the growth of phytopathogens fungi at 6-8 d post-evaluation (Table 1, Figure 1). Petri dishes of the controls of both *T. asperellum* isolates were completely covered by the growth of the fungi at the third day post-inoculation. Meanwhile at sixth day post-inoculation, both TC1 and TC2 isolates, came in contact with *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, and *A. alternata* except with *A. nidulans*. The highest PRGI rates were shown in *B.*

cepa 06CK005, *Aspergillus nidulans* cepa UOA/HCPF, *Alternaria alternata* cepa HMY 2-1, los cuales tuvieron un 99-100 % de identidad, excepto *P. crustosum*, que mostró un 78 % de identidad, y una máxima similitud con las máximas puntuaciones y las claves taxonómicas, correspondiendo a cada cepa y de acuerdo con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI), obtenidas por el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Así mismo, los datos de la secuenciación mostraron que los aislados de los hongos y bacterias antagonistas identificados fueron: *Trichoderma asperellum* TC1 cepa LAHC-FFPK-M16- y *Trichoderma asperellum* TC2 cepa BHU-BOT-RYRL16, *Bacillus methylotrophicus* cepa IS04, *Bacillus amyloliquefaciens* cepa Abk-2, tuvieron 99-100 % de identidad y las máximas puntuaciones, al ser comparadas con las secuencias del GenBank, obtenidas por el algoritmo de BLAST en la base de datos del NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

Actividad antagónica.

In vitro. El crecimiento radial de los cinco

Table 1. *In vitro* radial growth of phytopathogenic fungi, when inhibited by *Bacillus* species 14 d post-inoculation and by *Trichoderma* species at sixth day of incubation.

Cuadro 1. Crecimiento radial *in vitro* de hongos fitopatógenos, al ser inhibidos por especies de *Bacillus* a los 14 d post-inoculación y por especies de *Trichoderma* a los seis días de incubación.

| Phytopathogens fungi | Inhibition of pathogen (%) \pm SD | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | <i>B. methylotrophicus</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>T. asperellum</i> TC1 | <i>T. asperellum</i> TC2 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 42.0 \pm 7.2 b* | 51.5 \pm 5.9 b | 52.3 \pm 2.9 d (1) | 43.3 \pm 3.5 e (1) |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 69.0 \pm 3.3 a | 63.5 \pm 4.7 a | 71.6 \pm 4.0 a (1) | 69.8 \pm 4.7 a (1) |
| <i>Penicillium crustosum</i> | 47.3 \pm 5.9 b | 41.1 \pm 3.3 d | 52.3 \pm 2.7 d (1) | 52.0 \pm 3.1 c (2) |
| <i>Alternaria alternata</i> | 66.0 \pm 7.5 a | 64.1 \pm 3.7 a | 62.0 \pm 4.1 b (1) | 56.0 \pm 2.1 b (1) |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 46.7 \pm 4.3 b | 47.6 \pm 4.1 c | 58.8 \pm 4.5 c (2) | 47.2 \pm 6.6 d (2) |

*Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ($P \leq 0.05$) / Las letras en la misma columna, indican diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra, no son significativamente diferentes (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Antagonistic activity was measured according to scale of Bell *et al.* (1982) where: (1) antagonist (*Trichoderma*) overgrown completely on pathogen's colony and completely covered medium's surface, and (2) antagonist (*Trichoderma*) two thirds of medium surface overgrown. SD= Standard deviation / La actividad antagónica se midió de acuerdo con la escala de Bell *et al.* (1982) donde: (1) el antagonista (*Trichoderma*) sobrecrece completamente la colonia del patógeno y cubre completamente la superficie del medio, y (2) el antagonista (*Trichoderma*) sobrecrece dos tercios de la superficie del medio. DE= Desviación estándar.

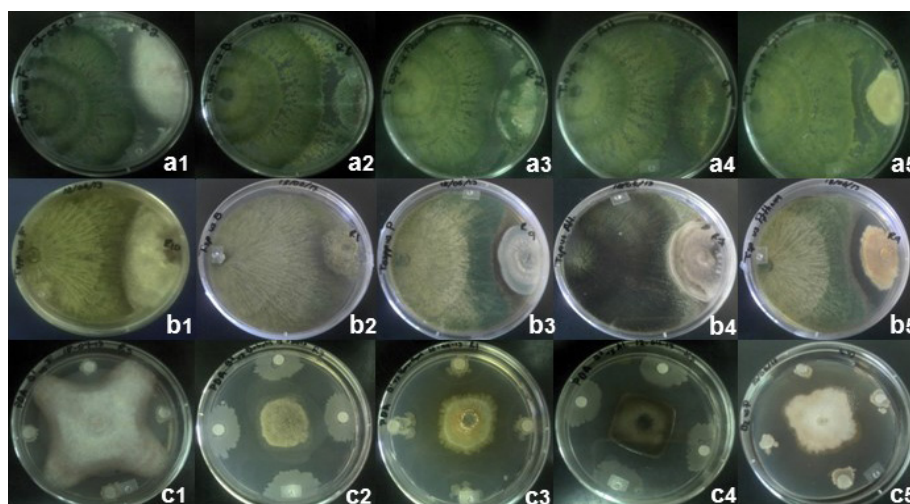


Figure 1. Mycoparasitism of *Trichoderma asperellum* TC1 (a1-a5) and *Trichoderma asperellum* TC2 (b1-b5), and inhibition halos of *Bacillus amyloliquefaciens* (c1-c5) when confronted *in vitro* against *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata*, and *Aspergillus nidulans*, respectively, at 14 d post-inoculation.

Figura 1. Micoparasitismo de *Trichoderma asperellum* TC1 (a1-a5) y *Trichoderma asperellum* TC2 (b1-b5), y halos de inhibición de *Bacillus amyloliquefaciens* (c1-c5) al ser confrontado *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* y *Aspergillus nidulans*, respectivamente, a los 14 d post-inoculación.

fabae with both *T. asperellum* TC1 and TC2 isolates with 71.6 and 69.8 %, respectively (Table 1), while the lowest rates were observed in *P. crustosum* and *F. oxysporum* with 52.3 and 43.3 %, respectively (Table 1).

In vitro evaluations against *A. nidulans*, inhibition halos of 2.6 and 4.5 mm were observed with *T. asperellum* TC1 and TC2 isolates, respectively (Table 2, Fig. 1), this may be due to the production of volatile compounds that inhibited the growth of *Trichoderma* spp., even so, both isolates were efficient to reduce the phytopathogenic fungi growth at sixth day post-inoculation (Duffy *et al.*, 2003; Harman, 2006; Zeilinger and Omann, 2007; Vinale *et al.*, 2008). To respect, Cooney *et al.* (2001), mentioned that *T. harzianum* produces the antibiotic 6-pentyl- α -pyrone, which has a dual effect in inhibiting the growth of the pathogen and can also regulate genes for trichotecenes biosynthesis and micotoxines with broad spectrum antimicrobial activity. Also, Gajera and Vakharia

hongos fitopatogénicos evaluados, se redujo significativamente al ser evaluado *in vitro* contra *T. asperellum* TC1 y TC2, donde ambos hongos antagonistas mostraron una eficiencia significativa al inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos a los 6-8 d post-evaluación (Cuadro 1, Figura 1). Las cajas de Petri de los testigos de ambos aislados de *T. asperellum*, fueron completamente cubiertas por el crecimiento de los hongos al tercer día de post-inoculación. Mientras tanto, al sexto día post-inoculación, ambos aislados TCI y TC2, entraron en contacto con *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, and *A. Alternata*, excepto con *A. nidulans*. Los valores más altos de PICR se mostraron en *B. fabae* con ambos aislados de *T. asperellum* TC1 y TC2 con 71.6 y 69.8 %, respectivamente (Cuadro 1), mientras que los valores más bajos se observaron en *P. crustosum* y *F. oxysporum* con 52.3 y 43.3 %, respectivamente (Cuadro 1).

En las evaluaciones *in vitro* contra *A. nidulans*, se observaron halos de inhibición de 2.6 y 4.5 mm

(2010) reported a highest inhibition of the growth of *A. niger*, caused by *T. viride* and *T. harzianum* during a study performed *in vitro*. Besides having the ability to produce wall cell degrading enzymes such as chitinase, β -1,3 glucanase, and protease in the culture medium during the *in vitro* antagonism. On the other hand, the antagonist or their purified antibiotics, can reduce the production of deoxynivalenol by >80 % and antagonistic genes are up-regulated by the presence of the pathogen (Duffy *et al.*, 2003). Therefore, the efficiency of *Trichoderma* spp. to inhibit phytopathogens fungi may have been due to their competition for space and nutrients, antibiotic production (volatile and non-volatile compounds), mycoparasitism and inactivation of the pathogen's enzymes (Ezziyani *et al.*, 2004).

In addition, an inhibition halo was observed in *T. asperellum* TC2 isolate when evaluated *in vitro* against *P. crustosum* (Table 2), this might be due to patulin production, a secondary metabolite produced by this phytopathogen (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

The growth inhibition of the pathogenic fungi colonies, induced by *B. methylotrophicus* and *B. amyloliquefaciens*, was significantly different,

con los aislados de *T. asperellum* TC1 y TC2, respectivamente (Cuadro 2, Figura 1), esto puede deberse a la producción de compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento de *Trichoderma* spp., aún así, ambos aislados fueron eficientes en reducir el crecimiento de los hongos fitopatógenos al sexto día de post-inoculación (Duffy *et al.*, 2003; Harman, 2006; Zeilinger and Omann, 2007; Vinaile *et al.*, 2008). Al respecto, Cooney *et al.* (2001), mencionan que *T. harzianum* produce el antibiótico 6-pentil- α -pirone, el cual tiene un efecto dual en la inhibición del crecimiento del patógeno y también puede regular los genes por la biosíntesis de tricotecenos y micotoxinas con actividad antimicrobiana de amplio espectro. Asimismo, Gajera and Vakharia (2010) reportaron una alta inhibición del crecimiento de *A. niger* causada por *T. viride* y *T. harzianum* durante un estudio realizado *in vitro*. Además de tener la habilidad para producir enzimas que degradan la pared celular tales como la quitinasa, β -1,3 glucanasa y proteasa en el medio de cultivo durante el antagonismo *in vitro*. Por otra parte, el antagonista o sus antibióticos purificados, pueden reducir la producción de deoxinivalenol por debajo del 80 % y los genes antagónicos están regulados por la presencia del patógeno (Duffy *et*

Table 2. Inhibition halo between colonies of phytopathogenic fungi and the antagonistic *Bacillus* species 14 d post-inoculation and *Trichoderma asperellum* isolates at 6 d of incubation.

Cuadro 2. Halo de inhibición entre las colonias de hongos fitopatógenos y las especies antagonicas de *Bacillus* a los 14 d post-inoculación y aislados de *Trichoderma asperellum* a los 6 d de incubación.

| Phytopathogens fungi | Inhibition halo (mm) by antagonistic \pm SD | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Bacteria | | Fungi | |
| | <i>B. methylotrophicus</i> | <i>B. amyloliquefaciens</i> | <i>T. asperellum</i> TC1 | <i>T. asperellum</i> TC2 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 4.95 \pm 2.2 c* | 4.15 \pm 2.1 c | 0 b | 0 c |
| <i>Botrytis cinerea</i> | 13.15 \pm 2.8 a | 8.45 \pm 1.3 a | 0 b | 0 c |
| <i>Penicillium crustosum</i> | 10.45 \pm 1.9 b | 6.10 \pm 1.1 b | 0 b | 2.6 \pm 1.1 b |
| <i>Alternaria alternata</i> | 12.45 \pm 3.3 a | 5.50 \pm 1.6 b | 0 b | 0 c |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | 5.85 \pm 1.5 c | 7.60 \pm 1.0 a | 2.6 \pm 0.6 a | 4.5 \pm 0.9 a |

*Letters in the same column indicate significant differences in the treatments where the means followed by the same letter are not significantly different (ANOVA) according to Tukey's test ($P \leq 0.05$). SD= Standard deviation / Las letras en la misma columna, indican diferencias significativas en los tratamientos donde las medias seguidas por la misma letra, no son significativamente diferentes (ANVA) de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). DE= Desviación estándar.

where the highest effect was observed in *B. cinerea* with PGRIs of 69 and 63.5 %, respectively, *A. alternata* showed PGRIs 66 and 64.1 %, respectively; whereas the lowest growth reductions were registered for *F. oxysporum*, *P. crustosum*, and *A. nidulans* (Table 1). These results are similar to those obtained by Madhaiyan *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2012) who found a high capacity of some strains of *Bacillus* of the same species to inhibit the growth of several phytopathogens fungi, which was due to the production of volatile compounds and antibiotics belonging to the family of iturins and subtilins, that act on the fungi's cell wall. Also, the production of hydrophilic enzymes to break down polysaccharides, nucleic acids and lipids, which are used as an energy source, might have been involved.

Bacillus amyloliquefaciens and *B. methylotrophicus* induced an inhibition halo of the pathogen colony at 14 d post-incubation (Table 2). Mean values per antagonist showed that *B. methylotrophicus* had a higher antagonistic activity than *B. amyloliquefaciens*, since the average of inhibition halo was significantly, of 4.95 to 13.15 mm and 4.15 to 8.45 mm, respectively, in the phytopathogenic fungi colonies (Table 2). The highest inhibition halos produced by *B. amyloliquefaciens* and *B. methylotrophicus* were observed with *B. cinerea* with 8.45 and 13.25 mm, respectively, whereas the lowest rates were shown against *F. oxysporum* with 4.15 and 4.95 mm, respectively (Table 2). *Bacillus methylotrophicus* showed the highest antagonistic effect against phytopathogens that may be due to the production of antibiotics and/or volatile organic compounds as hydrogen cyanide which inhibit the growth of the phytopathogenic fungi and exert harmful effects on the *in vitro* growth of several phytopathogens, these compounds can have direct or indirect effects in the activity of specific fungal enzyme (Wheatley, 2002;

al., 2003). Por lo tanto, la eficiencia de *Trichoderma* spp. para inhibir hongos fitopatógenos puede deberse a su competencia por espacio y nutrientes, producción de antibióticos (compuestos volátiles y no volátiles), micoparasitismo e inactivación de las enzimas de los patógenos (Ezziyanyani *et al.*, 2004).

Además, un halo de inhibición se observó en el aislado *T. asperellum* TC2 cuando se evaluó *in vitro* contra *P. crustosum* (Cuadro 2), esto puede ser debido a la producción de patulina, un metabolito secundario producido por este fitopatógeno (Leelasuphakul *et al.*, 2008).

La inhibición del crecimiento de las colonias de hongos patógenos, inducida por *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens*, fue significativamente diferente, donde el mayor efecto se observó en *B. cinerea* con PICRs de 69 y 63.5 %, respectivamente, *A. alternata* mostró PICRs de 66 y 64.1 %, respectivamente; donde las menores reducciones del crecimiento se registraron para *F. oxysporum*, *P. crustosum* y *A. nidulans* (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Madhaiyan *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2012) quienes encontraron una alta capacidad de algunas cepas de *Bacillus* de las mismas especies para inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos, lo cual es debido a la producción de compuestos volátiles y antibióticos pertenecientes a la familia de las iturinas y subtilinas, que actúan en la pared celular de los hongos. También, la producción de enzimas hidrofílicas para destruir los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, los cuales son usados como fuente de energía y que podrían estar involucrados.

Bacillus amyloliquefaciens y *B. methylotrophicus* indujeron un halo de inhibición de la colonia del patógeno a los 14 d post-incubación (Cuadro 2). Las medias por antagonista, mostraron que *B. methylotrophicus* tuvo mayor actividad antagónica que *B. amyloliquefaciens*, ya que el promedio de los halos de inhibición fue significativo, de 4.95 a

Duffy *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), as also reported by Madhaiyan *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2012), who found that strains of *B. methylotrophicus* have a high antagonistic activity against a wide diversity of phytopathogens fungi.

According to Guillén-Cruz *et al.* (2006), *B. amyloliquefaciens* was the most efficient against *Phytophthora* spp. when evaluated *in vitro*, in addition to having an antagonistic effect and induce plant growth. To respect, Souto *et al.* (2004) mentioned that *B. amyloliquefaciens* strain added peptides and lipopeptides to the culture medium, such as fungicine, iturin, bacillomycin, among others, having antifungal properties when confronted *in vitro* against phytopathogenic fungi such as *Fusarium*, *Rhizoctonia*, and *Sclerotinia*.

Both antagonistic bacteria and fungi, significantly inhibited the *in vitro* growth of *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, *A. alternata*, and *A. nidulans*, where *B. methylotrophicus* and *T. asperellum* TC1, were the most efficient, which suggests the presence of bioactive compounds. Therefore, can be considered as viable biological control agents. So it is important to conduct more studies to identify those bioactive compounds and how they suppress the growth of the pathogens.

LITERATURE CITED

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Aquino-Martínez JG, Vázquez-García LM and Reyes-Reyes BG. 2008. Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26: 127-137. Available online: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v26n2/v26n2a5.pdf>
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B and Fickers P. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8: 1-12.

13.15 mm y 4.15 a 8.45 mm, respectivamente, en las colonias de hongos fitopatógenos (Cuadro 2). Los mayores halos de inhibición producidos por *B. amyloliquefaciens* y *B. methylotrophicus* se observaron con *B. cinerea* con 8.45 y 13.25 mm, respectivamente (Cuadro 2). *Bacillus methylotrophicus* mostró los mayores efectos antagónicos contra fitopatógenos, que puede deberse a la producción de antibióticos y/o compuestos orgánicos volátiles como cianuro de hidrógeno, el cual inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos y ejerce efectos nocivos en el crecimiento *in vitro* de varios fitopatógenos, estos compuestos pueden tener efectos directos e indirectos en la actividad de enzimas fúngicas específicas (Wheatley, 2002; Duffy *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012), así como también lo reportado por Madhaiyan *et al.* (2010) y Zhang *et al.* (2012), quienes encontraron que las cepas de *B. methylotrophicus* tienen una alta actividad antagónica contra una gran diversidad de hongos fitopatógenos.

De acuerdo con Guillén-Cruz *et al.* (2006), *B. amyloliquefaciens* fue el más eficiente contra *Phytophthora* spp. al ser evaluado *in vitro*, además de tener un efecto antagonista e inducir el crecimiento vegetal. Al respecto, Souto *et al.* (2004) mencionan que la cepa de *B. amyloliquefaciens* adiciona péptidos y lipopéptidos al medio de cultivo, tales como fungicina, iturina, bacilomicina, entre otros, teniendo propiedades antifúngicas al ser confrontada *in vitro* contra hongos fitopatógenos tales como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia*.

Ambos antagonistas, bacterias y hongos, inhibieron significativamente el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *P. crustosum*, *A. alternata*, y *A. nidulans*, donde *B. methylotrophicus* y *T. asperellum* TC1, fueron los más eficientes, lo cual sugiere la presencia de compuestos bioactivos. Por lo tanto, pueden ser considerados como agentes de control biológico viables. Por lo que, es importante llevar a cabo más estudios para identificar esos

- <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>.
- Bell D, Well H and Markham C. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382. Available online: https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1982Articles/Phyto72n04_379.PDF.
- Cooney JM, Lauren DR and di-Menna M.E. 2001. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 522-526. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0006372>.
- Correa OS, Montecchia MS, Berti MF, Fernández-Ferrari M.C, Pucheu NL, Kerber NL and García AF. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 41: 185-194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.10.007>.
- Duffy B, Schouten A and Raaijmakers JM. 2003. Pathogen self-defense: Mechanism to counteract microbial antagonism. *Annual Review Phytopathology* 41: 501-538. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>.
- Dugan FM. 2006. The Identification of fungi. An illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. The American Phytopathological Society. U.S Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 176p.
- Ezziyanyani M, Pérez-Sánchez C, Requena ME, Rubio L and Candela-Castillo ME. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78. Available online: <https://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/08-BIOCONTROL.pdf>
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McGraw SL and Gurr SJ. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186-194. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10947>.
- Gajera HP and Vakharia DN. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 274-282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.04.005>.
- Guillén-Cruz R, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Padrón-Corral E and Reyes-Valdés MH. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 105-114. Available online: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61224204.pdf>
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96: 190-194. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-96-0190>.
- Harris CA, Renfrew MJ and Woolridge MW. 2001. Assessing the risks of pesticide residues to consumers: recent and future developments. *Food Additives & Contaminants* 18: 1124-1129. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030110050122>.
- compuestos bioactivos y la forma en que suprimen el crecimiento de los patógenos.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H and Nardon P. 1999. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont and *Wolbachia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6814-6819. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.12.6814>.
- Leelasuphakul W, Hemmanee P and Chuenchitt S. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.024>.
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon SW and Sa TM. 2010. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2490-2495. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.015487-0>.
- Raeder U and Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rios-Velasco C, Ruiz-Cisneros MF, Berlanga-Reyes DI, Acosta-Muñiz CH, Ornelas-Paz JJ, Romo-Chacón A, Salas-Marina MA and Ibarra-Rendón JE. 2014. Enfermedades radiculares en árboles de manzano y su manejo en huertos del estado de Chihuahua. *Boletín técnico* generado en el proyecto 362, CIAD, A.C. Fundación Produce Chihuahua. 54p. Available online: http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/8/2013/anuales/anu_362-25-2014-05-1.pdf
- SAS Institute. 2002. SAS User's Guide. Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC.
- Singh A and Islam MN. 2010. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora nicotianae*. *International Journal of Experimental Agriculture* 1: 20-25. Available online: [http://ggfjournals.com/assets/uploads/IJEA_20-25_\(Nazrul_vi\)_Report_soil_biol_final.pdf](http://ggfjournals.com/assets/uploads/IJEA_20-25_(Nazrul_vi)_Report_soil_biol_final.pdf)
- Souto GI, Correa OS, Montecchia MS, Kerber NL, Pucheu NL, Bachur M and García AF. 2004. Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1247-1256. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>
- Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL and Lorito M. 2008. A novel role of *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 80-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.05.005>.
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi.

- Morphologies of cultured fungi and key to species. Third edition. CRS Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York. 404 p.
- Wheatley R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 357-364.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1020592802234>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), pp. 315-322. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press.
- <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Zeilinger S and Omann M. 2007. *Trichoderma* biocontrol: Signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology* 1: 227-234. Available online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2759141/pdf/grsb-2007-227.pdf>
- Zhang QL, Liu Y, Ai GM, Mia LL, Zhen HY and Liu ZP. 2012. The characteristics of a novel heterotrophic nitrification-aerobic denitrification, *Bacillus methylotrophicus* strain L7. *Bioresource Technology* 108: 35-44.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.139>.