



## Bacterias promotoras del crecimiento en plantas con potencial agente biocontrolador a *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, y *Monilophthora roreri*

### Plant growth promoting bacteria with potential biocontrol agent of *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, and *Monilophthora roreri*

Jefferson Javier Guato-Molina<sup>1,\*</sup> ; Javier Andrés Auhing-Arcos<sup>2</sup> ; Jorge Abel Crespo-Ávila<sup>2</sup> ; Gabriel Alejandro Esmeraldas-García<sup>2</sup> ; Antonio Francisco Mendoza-León<sup>2</sup> ; Hayron Fabricio Canchignia-Martínez<sup>3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Nestle, Estación Experimental El Chollo, Quevedo, Los Ríos-Ecuador.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Los Ríos-Ecuador.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Carrera de Agronomía, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología, km 1.5 a Santo Domingo de los Tsáchilas, EC. 120501, Los Ríos-Ecuador.

Received June 12, 2019. Accepted August 27, 2019.

#### Resumen

El objetivo se enfocó en caracterizar el potencial antagonista de PGPR en inhibición al desarrollo micelial, conidios en *F. oxysporum* y esporas en *M. roreri*. La técnica de PCR se empleó para la identificación de *F. oxysporum* y *M. roreri*. Seleccionando las bacterias: *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, *Klebsiella variicola* BO3-4, *Enterobacter asburiae* BA4-19, *Enterobacter asburiae* PM3-14, *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas veronii* R4 y *Bacillus subtilis*. Se evaluaron actividades antagónicas: a) Inhibición micelial en *F. oxysporum* y *M. roreri*; b) Reducción en producción de conidios y esporas por 12 y 15 días post-incubación. La PCR confirmó la amplificación de 670 pb para *F. oxysporum*. La secuenciación de 750 pb definió un grado de similitud del 99% a *M. roreri*, al compararse con el GenBank de NCBI. La aplicación de *B. subtilis* es de mayor actividad antagónica a inhibición (micelial y conidios) con (95 y 90%) a *F. oxysporum*. La actividad de BO3-4 en *M. roreri* inhibe totalmente el desarrollo micelial y la producción de esporas 12 y 15 días post-incubación respectivamente. La selección de estos bio-controladores y su aplicación como consorcio ofrecerá una alternativa para beneficiar en la reducción de agroquímicos al cultivo de tomate y cacao.

**Palabras clave:** *F. oxysporum*; *M. roreri*; micelio; conidios; esporas; antagonico.

#### Abstract

The objective was to characterize the potential PGPR antagonist in the inhibition of mycelial development, conidia in *F. oxysporum* and spores in *M. roreri*. The PCR technique was used for the identification of *F. oxysporum* and *M. roreri*. Selecting the bacteria: *Acinetobacter calcoaceticus* BMR2-12, *Klebsiella variicola* BO3-4, *Enterobacter asburiae* BA4-19, *Enterobacter asburiae* PM3-14, *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas veronii* R4 and *Bacillus subtilis* ATCC-5540. Antagonistic activities were evaluated: a) Mycelial inhibition in *F. oxysporum* and *M. roreri*; b) Reduction in production of conidia and spores for 12 and 15 days' post-incubation. The PCR confirmed the 670 bp amplification for *F. oxysporum*. The 750 bp sequencing defined a degree of similarity of 99% to *M. roreri*, when compared to the NCBI GenBank. The application of *B. subtilis* is of greater antagonistic activity to inhibition (mycelial and conidia) with (95 and 90%) to *F. oxysporum*. The activity of BO3-4 in *M. roreri* totally inhibits mycelial development and spore production 12 and 15 days post-incubation respectively. The selection of these biocontrollers and their application as a consortium will offer an alternative to benefit in the reduction of agrochemicals in the cultivation of tomato and cocoa.

**Keywords:** *F. oxysporum*; *M. roreri*; mycelium; conidia; spores; antagonistic.

#### How to cite this article:

Guato-Molina, J.J.; Auhing-Arcos, J.A.; Crespo-Ávila, J.A.; Esmeraldas-García, G.A.; Mendoza-León, A.F.; Canchignia-Martínez, H.F. 2019. Bacterias promotoras del crecimiento en plantas con potencial agente biocontrolador a *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*, y *Monilophthora roreri*. Scientia Agropecuaria 10(3): 393 – 402.

\* Corresponding author

E-mail: [hanchignia@uteq.edu.ec](mailto:hanchignia@uteq.edu.ec) (H. Canchignia-Martínez).

© 2019 All rights reserved

DOI: [10.17268/sci.agropecu.2019.03.10](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.03.10)

## 1. Introducción

Las enfermedades fúngicas que afectan el sector agrícola en producción de fruta fresca, leguminosas y hortalizas son ocasionadas por *F. oxysporum* causante de la marchitez vascular en una amplia gama de especies vegetales como: *Lycopersicon esculentum*, *Carica papaya*, *Zea mays*, *Passiflora edulis* y *Phaseolus vulgaris* (Fernández y Suárez, 2009; Figueroa et al., 2010; Guédez et al., 2012; Montiel et al., 2005). Este hongo se agrupan en formas especiales basando a sus especies hospedadoras y la especificidad del cultivar (Lievens et al., 2007). La *M. royeri* (monilia) que origina la podredumbre de mazorca al cultivo *Theobroma cacao* (cacao) (Bowers et al., 2001), es la enfermedad causante de pérdidas mayores al 30%, pero en muchas localidades alcanzan el 100% (Phillips, 2006). La presencia de estos hongos patógenos reducen significativamente la producción agrícola y estrategias en contención de estas enfermedades se emplea compuestos químicos, sin embargo, estos tienen diversas consecuencias negativas al ambiente (Kah y Brown, 2006).

La pérdida en producción *Solanum lycopersicum* L. (tomate) es ocasionada por la marchitez por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) (Srivastava et al., 2010). *F. oxysporum* provoca la muerte prematura por marchitamiento asocia a la obstrucción de haces vasculares (Viana et al., 2003). Alternativas al control de la enfermedad que se vienen desarrollan son cultivares con resistencia a la marchitez, pero la continua aparición de razas de patógenos sigue siendo un problema continuo (Jones et al., 1991). Las estrategias al control biológico, se reportan al empleo de *P. fluorescens* LRB3W1 que inhibe el desarrollo y germinación de esporas *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, y su aplicación en invernadero en combinación con benomyl mejora su eficacia al control de esta enfermedad (Someya et al., 2007). Trabajos en contención de FOL, se basan en aplicaciones de *P. fluorescens* por su versatilidad de aplicación con *Glomus intraradices* y *Trichoderma harzianum*, reduciendo el índice de la enfermedad por FOL al 67% en campo (Srivastava et al., 2010).

La *M. royeri* infecta cualquier estadio al desarrollo de la mazorca del cacao, trasladándose directamente a través de la epidermis con síntomas en forma de necrosamiento, deformación de mazorca y madurez irregular (Evans, 2007). Los bio-controladores reportados para *M. royeri*, se basan en aplicaciones de especies

endofíticos de *Trichoderma*, como estrategia de contención a enfermedades del cacao. El empleo de *T. harzianum* DIS110a, *T. hamatum* DIS219b, *T. asperellum* TA, son eficientes al procesos de colonización del cacao (Bailey et al., 2008). La búsqueda de bio-controladores a *M. royeri* se enfocan al empleo de *Trichoderma* sp. (Bateman et al., 2005), y *Bacillus* sp. (Suárez y Rangel, 2013).

Las rizobacterias están asociados a partículas del suelo generando interacciones en el sistema radicular y la zona de rizosfera (Peña y Reyes, 2007). Las bacterias al género *Pseudomonas* spp son las más estudiadas, al tener la capacidad de producir metabolitos secundarios y antibióticos que actúan como compuesto fúngicos: *pioluteorina* (Pit), *pirrolnitrina* (Prn), *ácido fenazina-1-carboxílico* (PCA) y *2,4-diacetilfloroglucinol* (2,4 DAPG), que ejercen antagonismo a géneros de hongos como *Pythium* (Anjaiah et al., 1998), *Rhizoctonia* (Hill et al., 1994), *Sclerotinia* (McLoughlin et al., 1992). Las rizobacterias productoras de estos compuestos volátiles como cianuro de hidrogeno (HCN), proteasa (PR), antibióticos como (Prn y PCA) demuestran actividad antagonista a problemas fitopatógenos (Fischer et al., 2010). Donde la presencia de estos metabolitos antagónicos PR y HCN por *P. fluorescens* UTPF5 tiene efecto inhibitorio al desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* (Afsharmanesh et al., 2010). La aplicación de *P. aeruginosa* JO y JO7 tienen un potencial bio-controlador por su aplicación en tomate, que proporciona el desarrollo vegetativo y suprime la severidad de la enfermedad a *F. oxysporum* y *Alternaria solani* (Paramanandham et al., 2017). La efectividad de las rizobacterias como *Serratia plymuthica* AS13 se ha corroborado su mayor funcionalidad al control de *R. solani* (Neupane et al., 2015).

Las inadecuadas y excesivas aplicaciones de pesticidas al control de enfermedades dentro del cultivo de tomate y cacao, han originado cambios en su biodiversidad. Donde el empleo continuo de fungicidas incrementa el grado de tolerancia y su efectividad es variable a las estaciones húmedas. El trabajo se enfoca en evaluar alternativas al control biológico con la disponibilidad de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (PGPR) de actividad antagonista a hongos Ascomycota y Basidiomycota. Donde su objetivo se enfatizó en caracterizar el potencial antagonista de PGPR en inhibición al desarrollo micelial, de conidios en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y esporas en *M. royeri*.

## 2. Materiales y métodos

La investigación se ejecutó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), localizado en el Campus Universitario “Manuel Haz Álvarez” ubicado en el km 1,5 vía Quevedo – Santo Domingo. Sus coordenadas geográficas 01° 01” de latitud Sur y 79° 47” de longitud Occidental, ubicada a 73 msnm.

### Hongos patogénicos

La plantación de cacao CNN51 localizado Campus “La María”, de la UTEQ, km 7 vía Quevedo-El Empalme, se recolectaron mazorcas con síntomas a la enfermedad a *M. royeri*. Para el aislamiento de *M. royeri*, se ejecutó el protocolo descrito por Evans et al. (2013) ajustando modificaciones, donde se realizó un triple lavado con agua estéril y alcohol, con un corte en la epidermis se recuperó segmentos de (0,2 cm<sup>2</sup>) al área del corcho de mazorcas enfermas. Las muestras de tejido se incubaron en cajas monopetri con PDA suplementado con chloramphenicol (13 µg/mL), ampicilina (40 µg/mL) e incubadas por 15 días a 28 °C para el desarrollo completo del hongo. Su identificación se realizó por similitud de morfo-fisiología de la colonia del hongo (Phillips, 2003). La cepa patogénica FOL fue donada por Carmita Suarez del Laboratorio de Fitopatología de la UTEQ. Las muestras miceliales de (4 mm Ø), de los hongos patogénicos se ubicaron en criotubos con PDA, dejándolo crecer durante 5 días a 18 °C y procediendo a agregarle 400 µL de Glicerol para su almacenamiento a – 40 °C.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN<sub>g</sub> para FOL, se recuperó 1 g de micelio del hongo y pulverizado con N<sub>2</sub> líquido, obteniendo 400 mg de tejido macerado. En *M. royeri* se recuperó (4 mm Ø) del micelio y se incubó en medio líquido Caldo de Papa Dextrosa a 165 rpm por 10 días en (Benchmark, Incu-Shaker) hasta obtener un considerable desarrollo micelial, rescatando la parte sólida con 400 mg de muestra. La extracción de ADN<sub>g</sub> se realizó siguiendo las intrusiones del fabricante por DNeasy Plant Mini Kit de (QIAGEN-Start EE.UU.), para la purificación de ADN<sub>g</sub>, y diluido en 50 µL del tampón TE (Ácido tris-etilendiaminotetraacético 10 mM y EDTA pH 8,2). Las muestras de ADN<sub>g</sub> se visualizaron en geles de agarosa al 0,9% teñidos en bromuro de etidio.

### Caracterización molecular

Se realizó la identificación por PCR empleando los oligonucleótidos específicos

UniF (5´-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3´) y UniR (5´-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3´), que genera un fragmento entre 670 a 672 bp (Hirano y Arie, 2006). Para *M. royeri* se empleó los cebadores universales ITS4-F (5´TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´) y ITS5-R (5´GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3´) (White et al., 1990), que amplifican las regiones ribosomales, ITS (espacios de transcripto interno) que corresponde al gen del ADN<sub>r</sub> constituido por (ITS1 - 5.8S - ITS2) con un fragmento de 750 pb (Suárez, 2016).

La PCR se desarrolló en un volumen de 20 µL que contenía 4 µL Buffer (1X); 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (6 mM); 1 µL de DNTP´s (0,2 mM); 1 µL/cada primer (0,2 mM); 0,2 µL de Taq pol (Promega®); 1 µL de ADN (60 ng/mL); 10,6 µL de H<sub>2</sub>O. La reacción de la PCR se desarrolló en el termociclador (TECHME®). El perfil térmico en la PCR para FOL es: 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg; 55 °C por 60 seg; 72 °C por 1 min; extensión final de 72 °C por 10 min. La condición de PCR para *M. royeri*: 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg; 60 °C por 1 min; 72 °C por 1 min; extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y teñidos en bromuro de etidio. Los fragmentos se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen®). La secuencia única obtenida para *M. royeri* se purificó empleando el kit Invitrogen PureLink™ (GERMANY®), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El fragmento fue secuenciado por MACROGEN y comparado con la base de datos de GenBank de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), empleando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### Selección y preparación de inóculo bacteriano

Del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microbiología de la UTEQ, se seleccionaron las rizobacterias provenientes de cultivos endémicos de Musáceas con su clasificación a metabolitos antagonicos (Tabla 1). Además, se emplearon cepas control *P. protegens* CHA0 (donadas por Dieter Haas Ph.D), *P. veronii* R4 y *Bacillus subtilis* ATCC 5540 (donada por Humberto Prieto Ph.D). Las rizobacterias se incubaron en King B líquido a 170 rpm/48 h a 28 °C [(g/L): peptona, 20; glicerol, 15 mL; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5; MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,5; agar, 15; agua destilada (pH 7,2)], suplementado con chloramphenicol (13 µg/mL), ampicilina (40 µg/mL) (King et al., 1954).

**Inhibición al desarrollo micelial y producción de conidios/esporas**

Las bacterias se incubaron en King-B líquido a 170 rpm/24 h a 28 °C, recuperando 0,6 mL del crecimiento bacteriano y homogenizadas en placas Petri con 14,4 mL de PDA e incubado por 16 h/28 °C, posterior se añadió un disco de (6 mm Ø) micelial de FOL e incubados a 28 °C, para su evaluación por 4, 8 y 12 días post-incubación (DPI). El ensayo antagonista se diferencia con el anterior patógeno al crecimiento lento de *M. royeri* en PDA, donde su evaluación se realizó añadiendo un disco de (6 mm Ø) en el extremo de la placa Petri con PDA que corresponde al micelio del hongo, enfrentándose al disco de agar con la bacteria previamente incubada a 16 h/28 °C, evaluando por 9, 12 y 15 DPI. Los dos patógenos se evaluó el porcentaje de inhibición micelial desde el borde del tarugo hasta el crecimiento del hongo por la fórmula: % inhibición = (crecimiento del control – crecimiento del tratamiento / crecimiento del control) x 100. Al final de la evaluación en inhibición micelial por 12 y 15 DPI, se procedió el conteo de conidios y esporas (C y E) para

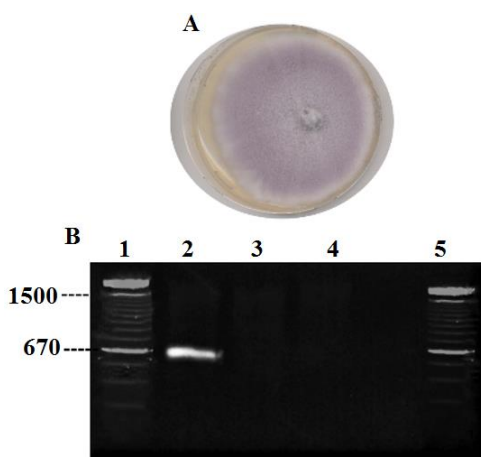
FOL y *M. royeri*, homogenizando el micelio de las placas Petri con (10 mL de H<sub>2</sub>O + Tween 20). Recuperando 1 mL de cada placa y transfirido a tubos eppendorf de 1,5 mL que contenían gaza estéril, que permitió la separación del micelio de (C y E). Las muestras de 20 µL se ubicaron al centro de la cámara de Neubauer, realizando el conteo en cinco de los cuadrantes de 0,20 mm<sup>2</sup>, observando por el microscopio OLYMPUS (ocular 10X y objetivo 40X). Se determinó la cantidad de (C y E) /mL = (# de (C y E) contadas x 25000 x factor de dilución). Además, se verificó porcentaje de inhibición a (C y E) = (número de (C y E) del control – número de (C y E) del tratamiento / número de (C y E) del control) x 100.

En todos los experimentos los tratamientos contenían seis replicas experimentales y cada una con cuatro unidades experimentales. Los valores a cada condición están representados con el error estándar promedio individual (±), los tratamientos fueron sujetos al análisis de varianza por ANOVA, y separados por procedimiento de comparación múltiple de Tukey SD, al nivel de significancia de (p ≤ 0,05), empleando Statgraphics.

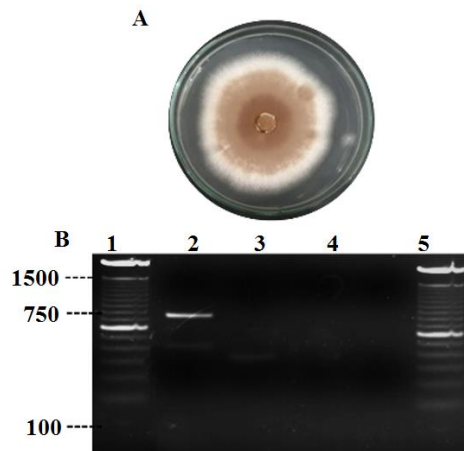
**Tabla 1**  
Caracterización de los aislados bacterianos a producción de metabolitos antagonicos

	Organismo	Cepas	Metabolitos antagonicos				Sideróforos	Producción AIA
			PR	HCN	Prn	DAPG		
1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	BMR2-12			+		+	
2	<i>Klebsiella variicola</i>	BO3-4	+	+	+		+	
3	<i>Enterobacter asburiae</i>	BA4-19	+				+	
4	<i>Enterobacter asburiae</i>	PM3-14	+	+	+		+	
5	<i>Pseudomonas protegens</i>	CHA0	+	+	+	+	+	
6	<i>Pseudomonas veronii</i>	R4	+		+		+	

Productoras de metabolitos secundarios: PR-Proteasa, HCN-cianuro de hidrogeno, Prn-pirrolnitrina, 2,4-DAPG *diacetilfloroglucinol*, sideróforos, AIA-ácido indol-3-acético (Chávez et al., 2018; Peñafiel et al., 2016).



**Figura 1.** Identificación de *M. royeri*. A. Desarrollo micelial del hongo en medio PDA por 12 días. B. Identificación por PCR, carril 1 y 5 (Lader 100 pb Invitrogen); 2 ADNg de (*F. oxysporum. lycopersich*); 3 (*M. royeri*); 4 Control agua.



**Figura 2.** Identificación de *M. royeri*. A. Desarrollo micelial del hongo en medio PDA por 15 días. B. Identificación por PCR, carril 1 y 5 (Lader 100 pb Invitrogen); 2 ADNg de (*M. royeri*); 3 (FOL); 4 Control agua.

### 3. Resultados y discusión

**Identificación de *F. oxysporum* y *M. roseri***  
 La identificación molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, se realizó por PCR, empleando los oligonucleótidos específicos UniF y UniR para este hongo, generando el fragmento de 670 bp. La veracidad de la amplificación fue determinada al no visualizar el producto de amplificación teniendo como control el ADNg de *M. roseri*, y agua (Figura 1). El alineamiento de los oligonucleótidos resultan ser específico para este patógeno, permitiendo diferenciar entre otras formas especiales para *F. oxysporum* (Hirano y Arie, 2006). Las mazorcas del cultivar CCN51 de la Finca la María con síntomas de la enfermedad se recuperó la parte seccional del corcho, obteniendo el crecimiento micelial del *M. roseri* (Cepa 1), observando

la formación del borde regular y textura polvorienta de un rango de color (café oscuro - crema - blanco) (Figura 2A). La técnica de PCR confirmo un producto de amplificación de 750 bp (Figura 2B). El alineamiento de secuencia al ADNr de las regiones ITS1 y ITS2 ha conducido en la identificación con fidelidad y discriminar de otras especies a *Moniliophthora* spp. La secuenciación y su alineamiento de la región (ITS1- 5.8S - ITS2) de *M. roseri* (cepa 1) tiene 99% de homología con la secuencia del ITS a la cepa aislada de cacao en Ecuador (AY194150) con diferencia en los nucleótidos 1315 y 1317 (Figura 3) (Griffith y Nicholson, 2002). Estas herramientas moleculares se complementan a los caracteres morfológicos en la identificación de especies para evaluar de forma rápida y confiable la diversidad biológica.

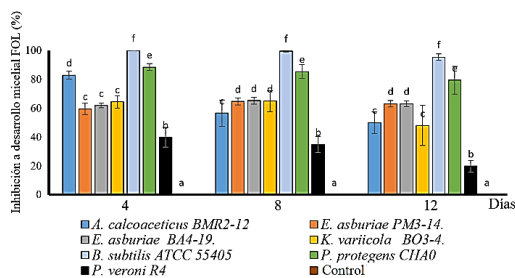
		601		650
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(601)	GGGGAATCCTTGTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATGATATGC	TTAAGTT	
Cepa (1)	(1)	-----ITS4-----		
		651		700
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(651)	CACCGCTACTCTACCTGATTGAGGTCAAAATGATCTAATTGTTGTC		
Cepa (1)	(1)	-----CTACCTGATTTGAGGTCAAAATGATCTAATTGTTGTC		
		701		750
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(701)	AATAAACTTAGGACAGTTTGAAGCAGATACCGTTCAATAACAGAGAGAGC		
Cepa (1)	(39)	AATAAACTTAGGACAGTTTGAAGCAGATACCGTTCAATAACAGAGAGAGC		
		751		800
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(751)	AGGTTTATTACAAAACCTGCAAGCCCCCAACCGAAGTGTAGCTAGGC		
Cepa (1)	(89)	AGGTTTATTACAAAACCTGCAAGCCCCCAACCGAAGTGTAGCTAGGC		
		801		850
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(801)	CAACATTCGAAAAAACGTAGACTAATGGCATAGATAAATATCACACCAAT		
Cepa (1)	(139)	CAACATTCGAAAAAACGTAGACTAATGGCATAGATAAATATCACACCAAT		
		851		900
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(851)	GTGGTCTACCAACCGGTTTCCACTAATGCATTTCAAGGAGCCGACTCTT		
Cepa (1)	(189)	GTGGTCTACCAACCGGTTTCCACTAATGCATTTCAAGGAGCCGACTCTT		
		901		950
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(901)	TATTCAAAAAGCCAGCAACCCCTCACATCCAATCCTCAAACAAAGCCGAAA		
Cepa (1)	(239)	TATTCAAAAAGCCAGCAACCCCTCACATCCAATCCTCAAACAAAGCCGAAA		
		951		1000
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(951)	AAGCTTTTGTAGGTTGAGAATTTAATGACACTCAACAGGCATGCCTCTC		
Cepa (1)	(289)	AAGCTTTTGTAGGTTGAGAATTTAATGACACTCAACAGGCATGCCTCTC		
		1001		1050
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1001)	GGAATACCAAGAGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAA		
Cepa (1)	(339)	GGAATACCAAGAGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAA		
		1051		1100
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1051)	TTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTCTTCATCGATGC		
Cepa (1)	(389)	TTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTCTTCATCGATGC		
		1101		1150
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1101)	GAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAGTTTTAAAGGGTCAA		
Cepa (1)	(439)	GAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATAGTTTTAAAGGGTCAA		
		1151		1200
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1151)	TTAAGTCCCAATAAATACACATCTTAAACATACATTAAGTGTGTGTTAA		
Cepa (1)	(489)	TTAAGTCCCAATAAATACACATCTTAAACATACATTAAGTGTGTGTTAA		
		1201		1250
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1201)	AACATAGTGAGACTCCGTTACTGAGAAAACGCAAGCGCTCCCGTTCCAGA		
Cepa (1)	(539)	AACATAGTGAGACTCCGTTACTGAGAAAACGCAAGCGCTCCCGTTCCAGA		
		1251		1300
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1251)	ATCCACTACAAAAGGTTTACAGGTGGATGAAGATTTGAAAGTCGGCGAGCA		
Cepa (1)	(589)	ATCCACTACAAAAGGTTTACAGGTGGATGAAGATTTGAAAGTCGGCGAGCA		
		1301		1350
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1301)	CATGCCCTAAGAAAGCAGCTCAAAACCTCCTTTACAATGTTTTCAAT		
Cepa (1)	(639)	CATGCCCTAAGAAAGCAGCTCAAAACCTCCTTTACAATGTTTTCAAT		
		1351		1400
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1351)	AATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAACCTTGTACGACTTTTACT		
Cepa (1)	(689)	AATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAACCTTGTACGACTTTTACT		
		1401		1433
<i>M. roseri</i> (AY194150.1)	(1401)	TCC-----ITS 5		
Cepa (1)	(739)	TCCATGCAGGGGAGGAAAGGAGGGATTAGTTA		

**Figura 3.** Alineamiento parcial de la secuencia al gen del ADNr. *M. roseri* (número de accesoión AY194150.1) y el ecotipo (Cepa 1) de CNN51-Finca La María. Las flechas y la tonalidad gris indican el sitio de alineamiento de los primers ITS4 y ITS5. La presencia del color amarillo indica la homología al alineamiento de secuencias, la tonalidad turquesa la diferencia entre los nucleótidos.

### Aplicación de PGPR en inhibición al desarrollo micelial en *F. oxysporum*

El proceso de evaluación antagonico obtenido en FOL a 4 DPI se destacan las bacterias *A. calcoaceticus* BMR2-12, *B. subtilis* y *P. protegens* CHA0 que superan el 80% en inhibición a crecimiento micelial. Donde la efectividad antagonica solo se mantiene por *B. subtilis* y *P. protegens* CHA0 hasta 8 y 12 DPI. Además, se verifica un constante efecto antagonico superior al 60% a 12 DPI por *E. asburiae* PM3-14 y BA4-19 (Figura 4). La actividad antagonica de las bacterias estaria regulada por la producción de metabolitos antagonicos como PR y Prn. También, se observa una baja actividad antagonica por aplicación de *A. calcoaceticus* BMR2-12, *K. variicola* BO3-4 y *P. veronii* R4 que no superan el 50% en inhibición a 12 DPI (Figura 4).

Estos procesos de evaluación inicial *in vitro* han permitido seleccionar microorganismos antagonicos de mayor potencial en inhibición al desarrollo micelial a FOL, donde la producción diferencial de metabolitos antifungicos lideran las respuestas antagonicas entre (60 y 70%) por *P. protegens* CHA0, *E. asburiae* PM3-14 y *E. asburiae* BA4-19 (Figura 4). Las aplicaciones de bacterias promotoras a crecimiento como *B. subtilis* MAA03 y *P. fluorescens* MAA10 solas o combinadas actúan como bio-control a *F. graminearum* (Moussa et al., 2013).



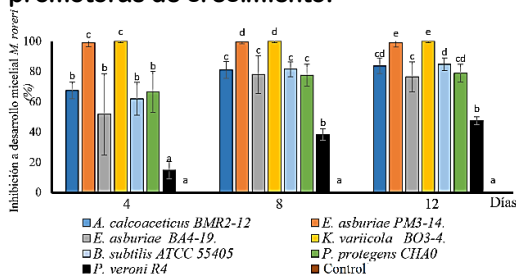
**Figura 4.** Actividad antagonica al desarrollo micelial en *F. oxysporum*. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ).

### Aplicación de PGPR en inhibición al desarrollo micelial en *M. roseri*

La actividad antagonica en inhibición al desarrollo micelial a *M. roseri* se destaca *E. asburiae* PM3-14 y *K. variicola* BO3-4 que imposibilitó la formación de micelio del 100% hasta los 15 DPI. En este hongo se acentúa una mejor eficacia por *A. calcoaceticus* BMR2-12 y *E. asburiae* BA4-19 que superan el 75% de inhibición hasta los 15 DPI (Figura 5). La rizobacteria *P.*

*veronii* R4 se verifica la menor actividad antagonica al desarrollo micelial en *M. roseri* y FOL.

Estas bacterias gram-negativas *E. asburiae* PM3-14 y *K. variicola* BO3-4 tienen la característica en producir (PR, HCN, Prn) (Chávez et al., 2018), donde la efectividad de estos metabolitos secundarios inhiben el desarrollo micelial a FOL y *M. roseri*. Esto se corrobora con Nutaratat et al. (2017), que el empleo *in vitro* de *Enterobacter* sp DMKU-RP2016 tiene actividad antagonica a *F. moniliforme* y *R. solani*. La síntesis de metabolitos secundarios a (HCN y sideróforos), cumplen un rol importante como bio-control en *Macrophomina phaseolina*, *R. solani* y *Alternaria* spp (Sandhya et al., 2017), determinando que esta clase de género de bacterias endófitas son fuentes importantes de rizobacterias promotoras de crecimiento.

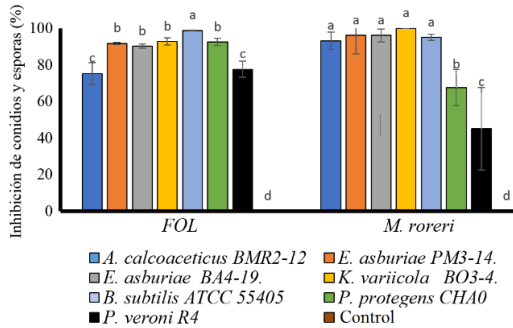


**Figura 5.** Actividad antagonica al desarrollo micelial de *M. roseri*. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ).

### Inhibición de conidios en *F. oxysporum* y esporas en *M. roseri*

El mecanismo de dispersión del hongo por producción de conidios en FOL se verificó con la reducción significativa *in vitro* en presencia de *B. subtilis*, *K. variicola* BO3-4, *P. protegens* CHA0, *E. asburiae* BA4-19 y PM3-14, demostrando efectividades superiores al 90% en la reducción de conidios. El hongo a no ser sometido con las bacterias genera 1475593 conidios/ mL a 12 DPI (Figura 6). La eficacia de *B. subtilis* ATCC 55405 a FOL con el 95% inhibición al desarrollo micelial del hongo y la reducción del 75% de las esporas estaría participando en inhibir la fase sexual y asexual del ciclo vida de *F. oxysporum*; donde la producción de enzimas hidrolíticas como: surfactina e iturrina A degradan la membrana citoplasmática de hongos filamentosos (Cazorla et al., 2007; Chitarra et al., 2003). En los ensayos antagonistas a inhibición de esporas de *M. roseri* revelaron una efectividad superior al 90% en presencia de *K. variicola* BO3-4, *B. subtilis*, *A.*

*calcoaceticus* BMR2-12, *E. asburiae* BA4-19 y PM3-14. Con baja efectividad antagonista por *P. protegens* CHA0 y *P. veronii* R4 que no superan el 65% de inhibición de esporas. El hongo a no estar expuesta a ensayos antagónicos genera 180125 esporas/mL a 12 DPI. La eficacia de *K. variicola* BO3-4 está determinada por la producción de tres metabolitos antagónicos, donde la funcionalidad del HCN tiene una toxicidad de amplio espectro para hongos, nematodos e insectos por la sensibilidad del grupo-hemo en las células eucariotas (Zdor, 2014). La funcionalidad del HCN microbiano producido en la rizosfera depende de la geoquímica del suelo (Rijavec y Lapanje, 2016). Este tipo de género a *K. variicola* DX120E, producen sideróforos y enzimas que degradan de pared celular de hongos fitopatógenos (Lin et al., 2015).

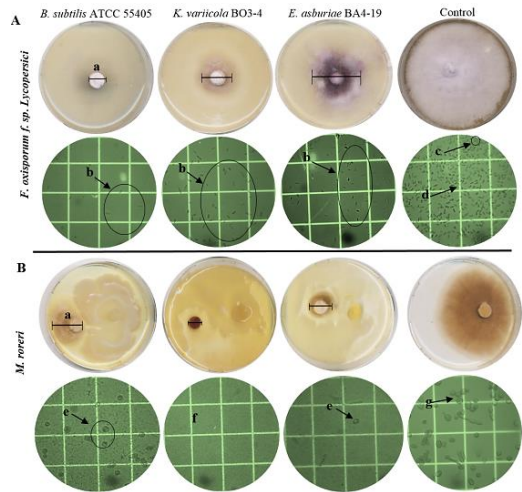


**Figura 6.** Inhibición en producción de conidios y esporas en *F. oxysporum* y *M. royeri*. Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ( $p \leq 0,05$ ), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ( $\pm$ ).

### Cambios estructurales del micelio, conidios y esporas

El efecto antagónico de *B. subtilis* ejerce cambios estructurales *in vitro* en FOL de inhibición a desarrollo y degradación del micelio con ausencia de macroconidios. En presencia de *K. variicola* BO3-4 y *E. asburiae* BA4-19 se determinó la disminución y mal formaciones de macroconidios y conidios (Figura 7A). Esto concuerda con Gu et al. (2017), ellos explican que la producción de Bacilomicina D por *B. subtilis* interrumpe las membranas plasmáticas de las hifas y los conidios de *F. graminearum*, provocando la filtración del citoplasma y plasmólisis. Donde el esteroles de la membrana plasmática de las paredes celulares de hifas y conidios estaban dañados por la adición de Bacilominina D, por pérdida de turgencia y estructuras con huecos al visualizarse por microscopía electrónica (Gu et al., 2017).

El caso de *M. royeri* expuesta a antagonismo con *K. variicola* BO3-4 se observó un ligero desarrollo micelial, pero total ausencia de endosporas. Además, se verifica la disminución en producción de endosporas por el enfrentamiento con *E. asburiae* PM3-14, *B. subtilis*, *E. asburiae* BA4-19 y *A. calcoaceticus* BMR2-12. Sin aplicación bacteriana se observa un crecimiento normal de micelio con presencia de endosporas (Figura 7B). La respuesta antagonista está liderada por la actividad proteolítica de *K. variicola* BO3-4, *A. calcoaceticus* BMR2-12, *E. asburiae* BA4-19 y PM3-14 que reducen el desarrollo micelial y formación de esporas. Esta enzima lítica degrada la pared celular de hongos fitopatógenos que actúan como factores bio-controladores (Infante et al., 2009). Donde se explica que estas enzimas sintetizadas por *Pseudomonas* y *Bacillus* tiene capacidad en degradar los componentes estructurales (proteínas, quitina y lípidos) permitiendo la colonización de las bacterias a los tejidos internos del patógeno (Yang et al., 2013).



**Figura 7.** Inhibición y cambios al desarrollo micelial, conidios y esporas. A) Actividad antagónica de PGPR a *F. oxysporum* a 12 DPI. (a) inhibición al desarrollo micelial; (b) reducción en producción de conidios; (c) producción de macroconidios; (d) producción de conidios. B) Actividad antagónica de PGPR a *M. royeri* a 15 DPI. (e) reducción en producción de endosporas; (f) ausencia de endosporas; (g) producción de endosporas.

La presencia de Prn en *K. variicola* BO3-4, *A. calcoaceticus* BMR2-12, *E. asburiae* PM3-14 sería uno de los componentes que responden como antagonismo a *M. royeri*. La actividad de Prn se dirige a las mitocondrias y perjudica al receptor de electrones terminales, siendo los sitios objetivo para este biopesticida (Anderson y Kim, 2018). Además, Prn altera la

señalización del estrés osmótico en hongos (Okada et al., 2005). Los factores minerales en la rizosfera pueden influir en la síntesis de Prn, donde la disponibilidad de Fe es importante para la síntesis de este antibiótico (De Laurentis et al., 2007).

Los resultados en este trabajo al mecanismo antagónico de las bacterias difieren entre ellas, donde la efectividad *B. subtilis* prevalece para hongos Ascomycota, a diferencia que la aplicación de *K. variicola* BO3-4, *A. calcoaceticus* BMR2-12, *E. asburiae* BA4-19 y PM3-14 ejerce mayor actividad a Basidiomycota. Donde intervienen los cambios osmóticos del patógeno por la producción de Prn. La PR degradando los componentes estructurales del hongo como (proteínas, quitina y lípidos). El HCN modificando la sensibilidad del grupo-hemoproteínas en las células eucariotas.

#### 4. Conclusiones

El proceso de inhibición por *B. subtilis* es efectiva en desarrollo micelial y producción de conidios de FOL, a diferencia al trabajar con *M. roleri* se verificó que la aplicación de *E. asburiae* PM3-14 y *K. variicola* BO3-4 son de mayor eficiencia en inhibir el micelio y esporas. Estas diferencias estarían acentuadas por la disponibilidad y producción del metabolito antagónico secretado por la bacteria. El trabajo se proyecta en la aplicación de estas PGPR a manera sola o la formación de consorcios bacterianos para determinar su actividad bio-controladora y evaluar su rol en promover el desarrollo en plantas.

#### Agradecimientos

El trabajo se financió por el Proyecto FOCICYT-2016 (Actividad nematocida a *Radopholus similis* por rizobacterias nativas y comerciales del género *Pseudomonas* spp.), otorgado por la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

#### ORCID

J. Guato-Molina  <https://orcid.org/0000-0002-6442-0149>  
 J. Auhing-Arcos  <https://orcid.org/0000-0003-4537-7234>  
 J. Crespo-Ávila  <https://orcid.org/0000-0002-7127-2818>  
 G. Esmeraldas-García  <https://orcid.org/0000-0001-8744-8905>  
 A. Mendoza-León  <https://orcid.org/0000-0001-5103-0152>  
 H. Canchignia-Martínez  <https://orcid.org/0000-0003-1195-5446>

#### Referencias bibliográficas

Afsharmanesh, H.; Ahmadzadeh, M.; Javan, M.; Behboudi, K. 2010. Characterization of the antagonistic activity of a new indigenous strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from onion rhizosphere. *Journal of Plant Pathology* 92: 187–194.

Anderson, A.; Kim, Y. 2018. Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas*

*chlororaphis* isolates. *Crop Protection* 105: 62–69.

Anjaiah, V.; Koedam, N.; Nowak, B.; Loper, J.; Höfte, M.; Tambong, J.; Cornelis, P. 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn 5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Molecular Plant-Pathology* 11: 847–854.

Bailey, B.; Bae, H.; Strem, M.; Crozier, J., Thomas, S.; Samuels, G.; Holmes, K. 2008. Antibiosis mycoparasitism and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46: 24–35.

Bateman, R.; Hidalgo, E.; García, J.; Arroyo, C.; Ten Hoopen, G.; Adonijah, V.; Krauss, U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Annals of Applied Biology* 147:129–138.

Bowers, J.; Bailey, B.; Hebbar, P.; Sanogo, S.; Lumsden, R. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress*. Disponible en: <http://www.plantmanagementnetwork.org/ph/elements/sum.aspx?id=111&photo=87>.

Cazorla, F.; Romero, D.; Pérez, A.; Lugtenberg, B.; Vicente, A.; Bloemberg, G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1950–1959.

Chávez, K.; Guato, J.; Peñafiel, M.; Mestanza, C.; Canchignia, H. 2018. Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivares nativos de *Musa* sp. y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S. *Agricultural Sciences* 11: 17–29.

Chitarra, G.; Breeuwer, P.; Nout, M.; Van Aelst, A.; Rombouts, F.; Abee, T. 2003. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology* 94: 159–166.

De Laurentis, W.; Khim, L.; Anderson, J.; Adam, A.; Phillips, R.; Chapman, S.; Naismith, J. 2007. The second enzyme in pyrrolnitrin biosynthetic pathway is related to the heme-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* 46: 12393–12404.

Evans, H. 2007. Cacao diseases-The trilogy revisited. *Phytopathology* 97: 1634–1639.

Evans, H.; Bezerra, J.; Barreto, R. 2013. Of mushrooms and chocolate trees: aetiology and phylogeny of witches broom and frosty pod diseases of cacao. *Plant Pathology* 7: 728–740.

Fernández, R.; Suárez, C. 2009. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *Passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 62: 4743–4748.

Figueroa, M.; Rodríguez, R.; Zulema, B.; González, M.; Pons, J. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la



- podrición de raíz de maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 124–134.
- Fischer, S.; Jofré, E.; Cordero, P.; Gutiérrez, F.; Mori, G. 2010. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. *International Journal of General and Molecular Microbiology*. 97: 241–251.
- Griffith, G.; Nicholson, J. 2002. Genetic diversity in the *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Sing. species complex. *Institute of Biological Sciences* 40: 1953–1959.
- Gu, Q.; Yang, Y.; Yuan, Q.; Shi, G.; Wu, L.; Lou, Z. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amylolique-faciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum* Qin. *Applied and Environmental Microbiology* 83: 1–17.
- Guédez, C.; Cañizalez, L.; Castillo, C.; Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate Clemencia. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología* 32: 44–49.
- Hill, D.; Stein, J.; Torkewitz, N.; Morse, A.; Howell, C.; Pachlatko, J.; Ligon, J. 1994. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 78–85.
- Hirano, Y.; Arie, T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology* 72: 273–283.
- Infante, D.; Martínez, B.; González, N.; Reyes, Y. 2009. Mecanismo de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 24: 14–21.
- Jones, J.; Jones, P.; Stall, R.; Zitter, T. 1991. Compendium of tomato Diseases. The American Phytopathological Society Press. Minnesota: APS Press. Pp 73.
- Kah, M.; Brown, C. 2006. Adsorption of ionisable pesticides in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 188: 149–217.
- King, E.; Ward, M.; Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301–307.
- Lievens, B.; Claes, L.; Vakalounakis, D.; Vanachter, A.; Thomma, B. 2007. A robust identification and detection assay to discriminate the cucumber pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and f. sp. *radicis-cucumerinum*. *Environmental Microbiology* 9: 2145–2161.
- Lin, L.; Wei, C.; Chen, M.; Wang, H.; Li, Y.; Li, Y.; Yang, L. 2015. Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. *Standards in Genomic Sciences* 10: 1–7.
- McLoughlin, T.; Quinn, J.; Bettermann, A.; Booklandt, R. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Applied ana Environmental Microbiology* 12: 1760–1763.
- Montiel, L.; González, F.; Sánchez, B.; Guzmán, S.; Gámez, F.; Acosta, J.; Rodríguez, R. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición, en cinco Estados del Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 1–7.
- Moussa, T.; Almaghrabi, O.; Moneim, A. 2013. Biological control of the wheat root rot caused by *Fusarium graminearum* using some PGPR strains in Saudi Arabia. *Annals of Applied Biology*, 163: 72–81.
- Neupane, S.; Finlay, R.; Alström, S.; Elfstrand, M.; Högberg, N. 2015. Transcriptional responses of the bacterial antagonist *Serratia plymuthica* to the fungal phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *Environmental Microbiology Reports*: 7: 123–127.
- Nutaratat, P.; Monprasit, A.; Srisuk, N. 2017. High-yield production of indole-3-acetic acid by *Enterobacter* sp. DMKU-RP206, a rice phyllosphere bacterium that possesses plant growth-promoting traits. *3 Biotech* 7: 1–15.
- Okada, A.; Banno, S.; Ichiishi, A.; Kimura, M.; Yamaguchi, I.; Fujimura, M. 2005. Pyrrolnitrin interferes with osmotic signal transduction in *Neurospora crassa*. *Pesticide Science Society of Japan* 30: 378–383.
- Paramanandham, P.; Rajkumari, J.; Pattnaik, S.; Busi, S. 2017. Biocontrol potential against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* and Tomato plant growth due to plant growth-promoting rhizobacteria. *International Journal of Vegetable Science* 23: 294–303.
- Peña, H.; Reyes, I. 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia* 32: 560–565.
- Peñafiel, M.; Torres, E.; Barrera, A.; Prieto, H.; Carriel, J.; Canchignia, H. 2016. Producción de ácido indol-3-acético por *Pseudomonas veronii* R4 y formación de raíces en hojas de vid “Thompson seedless” *in vitro*. *Ciencia y Tecnología* 9: 31–36.
- Phillips, W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans et al. as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Tesis doctorado, The University of Reading. USA. 373 pp.
- Phillips, W. 2006. La moniliasis del cacao: un enemigo que podemos y debemos vencer. Taller regional andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Documento desarrollado en cumplimiento del Convenio de Cooperación suscrito entre la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) Disponible en: <http://www.iica.int>.
- Rijavec, T.; Lapanje, A. 2016. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability

- of phosphate. *Frontiers Microbiology* 7: 1–14.
- Sandhya, V.; Shrivastava, M.; Ali, S.; Shiva, V. 2017. Endophytes from Maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress 1. *Russian Agricultural Sciences*, 43: 22–34.
- Someya, N.; Tsuchiya, K.; Yoshida, T.; Sawada, H. 2007. Combined application of *Pseudomonas fluorescens* strain LRB3W1 with a low dosage of benomyl for control of cabbage yellows caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Biocontrol Science and Technology*. 17: 20–31.
- Srivastava, R.; Khalid, A.; Singh, U.; Sharma, A. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control* 53: 24–31.
- Suárez, L. 2016. Molecular identification of *Monilophthora roreri* isolates from cocoa orchards in Norte de Santander. *Genomics, Molecular Genetics and Biotechnology*, 65: 51–57.
- Suárez, L.; Rangel, A. 2013. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Monilophthora roreri*. *Acta Agronomica* 62: 370–378.
- Viana, F.; Freire, F.; Cardoso, J.; Vidal, J. 2003. Principais doenças do maracujazeiro na região nordeste e seu controle. *Comunicado Técnico* 86: 1–11.
- White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *Academic Press* 2: 315–322.
- Yang, J.; Liang, L.; Li, J.; Zhang, K. 2013. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 7081–7095.
- Zdor, R. 2014. Bacterial cyanogenesis: impact on biotic interactions. *Journal of Applied Microbiology* 5: 267–274.