



Fecha de recibido: 26-04-2023

Fecha de aceptado: 14-07-2023

DOI: 10.22490/21456453.6789

CONTROL BIOLÓGICO CONTRA *Fusarium sp.* EN PLANTAS DE UCHUVA (*Physalis peruviana L.*) A NIVEL DE INVERNADERO MEDIANTE APLICACIÓN COMBINADA DE *Trichoderma SP.* Y *Bacillus SP.*

BIOLOGICAL CONTROL OF *Fusarium SP.* IN CAPE GOOSEBERRY PLANTS (*Physalis peruviana L.*) AT GREENHOUSE LEVEL BY COMBINED APPLICATION OF *Trichoderma SP.* AND *Bacillus SP.*

Marcela Mora López¹

Ana María Ochoa Aristizábal²

Víctor Manuel Osorio Echeverri³

¹ Profesional en Biotecnología, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia. marce0384@hotmail.com

² Profesional en Biotecnología, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia. anamariaochoaaristizabal@gmail.com

³ MSc Biotecnología, Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín-Colombia. victor.osorio@colmayor.edu.co

Citación: Mora, M., Ochoa, A. y Osorio, V. (2024). Control biológico contra *Fusarium sp.* en plantas de uchuva (*Physalis peruviana L.*) a nivel de invernadero mediante aplicación combinada de *Trichoderma sp.* y *Bacillus sp.* *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 15(2), 35-67. <https://doi.org/10.22490/21456453.6789>

RESUMEN

Contextualización: la producción de la uchuva (*Physalis peruviana* L.), una fruta exótica de gran importancia comercial en Colombia, se ha visto limitada por la presencia de *Fusarium* sp. que causa pérdidas de hasta el 40% de la producción; este patógeno se controla, principalmente, con productos de síntesis química.

Vacío de conocimiento: al uso individual de microorganismos para el control biológico se ha convertido en una estrategia útil para disminuir el impacto causado por *Fusarium* sp.; sin embargo, su actividad se encuentra limitada en campo y por lo tanto es necesario realizar combinaciones en consorcio de diferentes géneros microbianos como herramienta promisoría para el control biológico.

Objetivos: evaluar la actividad antagónica de la aplicación combinada de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. como biocontroladores de *Fusarium* sp. a nivel de invernadero en uchuva (*Physalis peruviana* L.)

Metodología: se realizó el aislamiento de microorganismos de muestras de suelo y material vegetal de un cultivo de uchuva. Los aislados consistentes con *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. fueron enfrentados en condiciones *in vitro* para determinar el porcentaje de inhibición sobre tres aislados de *Fusarium* sp. que mostraron patogenicidad en semillas de uchuva según su

germinación y longitud radicular. La actividad antagonista *in vivo* se probó de manera individual y en consorcio para aquel *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. que más inhibieron el aislado de *Fusarium* sp. con mayor índice de patogenicidad. Los aislados utilizados en el ensayo *in vivo* fueron identificados por técnicas morfológicas, moleculares y filogenéticas.

Resultados y conclusiones: se obtuvieron siete aislados consistentes con *Bacillus* sp. con actividad inhibitoria contra tres *Fusarium* sp. El aislado bacteriano IB4B (identificado como *Bacillus* sp.) registró el mayor porcentaje de inhibición (48%) y TV1 (*Trichoderma reesei*) fue el hongo con mayor actividad (64%), aunque no difiere estadísticamente de TV2 (identificado como *Trichoderma asperellum*). La prueba de patogenicidad indicó que UCMV21 (identificado como *Fusarium oxysporum*) inhibió la germinación del 58% de las semillas evaluadas. En pruebas *in vivo* en plántulas de uchuva, UCMV21 presentó baja patogenicidad al desarrollar pocos síntomas de marchitez vascular, sin embargo, los tratamientos con el consorcio de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp., lograron el control del patógeno y mejoraron la longitud radicular de las plántulas.

Palabras clave: biocontrol, biotechnology, inhibition, integrated pest control, phytopathology

ABSTRACT

Contextualization: The production of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), an exotic fruit of great commercial importance in Colombia, has been limited by the presence of *Fusarium* sp., which causes losses of up to 40% of production. This pathogen is controlled mainly with chemical synthesis products.

Knowledge gap: The individual use of microorganisms for biological control has become a useful strategy to reduce the impact caused by *Fusarium* sp. However, their activity is limited in the field; therefore, it is necessary to carry out combinations in consortiums of different microbial genera as a promising tool for biological control.

Objectives: To evaluate the antagonistic activity of the combined application of *Trichoderma* sp. and *Bacillus* sp. as biocontrol agents of *Fusarium* sp. at the greenhouse level in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.).

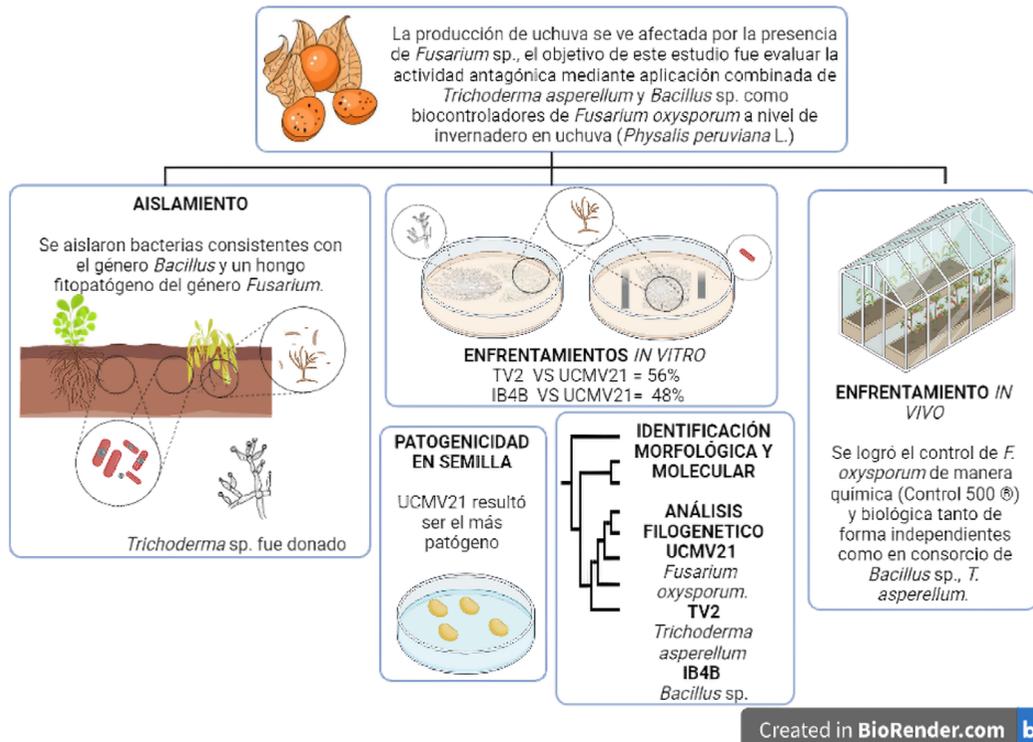
Methodology: Isolation of microorganisms from soil samples and plant material of a cape gooseberry crop was carried out. The isolates consistent with *Bacillus* sp. and *Trichoderma* sp. were tested under *in vitro* conditions to determine the percentage of inhibition on three isolates of *Fusarium* sp. that showed pathogenicity on cape gooseberry seeds according to

their germination and root length. *The in vivo* antagonistic activity was tested individually and in a consortium for those *Bacillus* sp. and *Trichoderma* sp. that most inhibited the isolate of *Fusarium* sp. with the highest pathogenicity index. The isolates used in the *in vivo* test were identified by morphological, molecular, and phylogenetic techniques.

Results and conclusions: Seven isolates consistent with *Bacillus* sp. with inhibitory activity versus three *Fusarium* sp. were obtained. Bacterial isolate IB4B (identified as *Bacillus* sp.) recorded the highest percentage of inhibition (48%), and TV1 (*Trichoderma reesei*) was the fungus with the highest activity (64%). However, it does not differ statistically from TV2 (identified as *Trichoderma asperellum*). The pathogenicity test indicated that UCMV21 (identified as *Fusarium oxysporum*) inhibited germination of 58% of the seeds evaluated. In *in vivo* tests on cape gooseberry seedlings, UCMV21 showed low pathogenicity as it developed few vascular wilt symptoms; however, treatments with the consortium of *Bacillus* sp. and *Trichoderma* sp. achieved control of the pathogen and improved the root length of the seedlings.

Keywords: biocontrol, biotechnology, inhibition, integrated pest control, phytopathology

RESUMEN GRÁFICO



Fuente: autores, creada con BioRender.com

1 INTRODUCCIÓN

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, cuenta con la producción de un fruto exótico ampliamente comercializado gracias a su sabor y su alta concentración de fenoles, carbohidratos y carotenoides como el β -caroteno o provitamina A (Corrales-Bernal *et al.*, 2015). Su deman-

da ha generado una importante entrada de ingresos para muchos países productores, incluyendo Colombia, Sudáfrica, Kenia, Egipto, Perú y Ecuador (Bazalar *et al.*, 2019). Según el Ministerio de Agricultura en Colombia, en el 2021 se alcanzó la mayor cifra de exportaciones con un valor de US\$37.820.445 y un aumento del

7% de toneladas vendidas con respecto al año anterior (ICA, 2022).

No obstante, diversos desafíos climáticos y fitosanitarios que causan pérdidas de hasta el 80% de la producción total en muchos de los casos, han limitado el cultivo de esta fruta (Fischer *et al.*, 2014; Granados *et al.*, 2019). En la última década, la variación del clima ha perturbado el crecimiento y la producción de este cultivo por el aumento en la temperatura, radiación y precipitaciones; si bien, el cultivo de uchuva no se ve fuertemente afectado por inundaciones severas, las condiciones de alta humedad alteran el ciclo de cultivo y lo exponen a diferentes ataques de enfermedades y plagas. Dentro de las principales afecciones fúngicas que perjudican a las plantaciones de uchuva se encuentran la mancha gris que se expresa sobre las hojas y el cáliz, producida por *Cercospora physalidis* Ellis; la muerte descendente ocasionada por *Phoma* sp. y el marchitamiento vascular por *Fusarium oxysporum*; esta última genera pérdidas del 40% del cultivo y es la más limitante y de mayor impacto económico (Díaz, *et al.*, 2012; Mayorga-Cubillos *et al.*, 2019). Se ha demostrado que *F. oxysporum* entra a la planta por el sistema radicular, obstruye y degrada los haces vasculares en los tallos, genera una coloración marrón en estos y ocasiona clorosis, pérdida de turgencia, baja producción de frutos y finalmente el perecimiento de la planta (de Lamo y Takken, 2020; Hudson *et al.*, 2021). Sin embargo, *F. oxysporum* no es la única especie del género que ataca el cultivo; *F. fujikuroi*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. ave-*

naceum, *F. sporotrichioides* y *F. verticillioides*, también pueden llegar a afectar a la uchuva y otros cultivos aledaños (Bakker *et al.*, 2018; Podgórska-Kryszczuk *et al.*, 2022; Toloza-Moreno *et al.*, 2020).

Para el control de estas enfermedades fúngicas se han propuesto estrategias según los mecanismos de infección y los síntomas causados, como el tratamiento con vapor y solarización del suelo (Dwivedi y Dwivedi, 2020) y el control químico con fungicidas como Captan, Tiram, Carben-dazim, Clorotalonil, Mancozeb, Metil tiofanato, Tebuconazol, Propiconazol y Dife-noconazol (Jamil y Ashraf, 2020; Kumari *et al.*, 2020). Sin embargo, muchos de estos fungicidas comerciales son poco efectivos, principalmente, por el desarrollo en estos patógenos de diferentes mecanismos de resistencia a ciertos compuestos, lo cual obliga al agricultor a usar dosis más elevadas o productos con categoría toxicológica más alta, lo cual aumenta los costos de producción y ocasiona un mayor impacto ambiental (Hu y Chen, 2021; Hudson *et al.*, 2021).

Esta situación ha impulsado la exploración de nuevas opciones de control biológico más eficientes y sostenibles aplicables en el manejo integral del marchitamiento vascular inducido por *Fusarium* sp. Muchos hongos y bacterias han mostrado un potencial para inhibir el crecimiento de organismos fitopatógenos y mitigar la infección causada por estos en cultivos vegetales, ya sea a través de antibiosis o por diversos mecanismos como el micoparasitismo, lisis enzimática y competen-

cia por espacio o nutrientes. De hecho, algunas bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* y hongos como *Trichoderma* sp. han mostrado un potencial para el control biológico de *Fusarium* sp. en cultivos como el de uchuva (Agarwal *et al.*, 2017; Anusha *et al.*, 2019; Islam *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Tsegaye *et al.*, 2018).

La capacidad antagonista exitosa de algunas especies del género *Trichoderma* se atribuye al micoparasitismo, la excreción de enzimas líticas que causan cambios estructurales a nivel celular en el patógeno, la competencia por espacio y nutrientes, la inhibición de las enzimas producidas por el patógeno para infectar la planta y la antibiosis debida a la producción de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que inhiben el crecimiento de otros hongos (Infante *et al.*, 2009; Mukhopadhyay y Kumar, 2020).

Por su parte, las bacterias aerobias formadoras de endosporas del género *Bacillus* con propiedades biocontroladoras, comúnmente son usadas como fungicida e insecticida debido a su interacción con las plantas en las que estimula una resistencia sistémica asociada a cambios fisiológicos y bioquímicos como la producción de fitoalexinas; esto potencia los

sistemas de defensa de las plantas cuando aquellas se encuentran expuestas a un factor de estrés como organismos patógenos. Además, las bacterias compiten en la rizosfera por espacio y nutrientes con los organismos fitopatógenos, lo que lleva a una limitación en el crecimiento de estos hongos en el suelo (Choudhary *et al.*, 2007; Fira *et al.*, 2018).

Aunque se ha demostrado el beneficio de diferentes tratamientos en condiciones *in vitro* y en campo con un único microorganismo como controlador de hongos patógenos, hay diversos factores en cada agroecosistema que influyen sobre la efectividad de estos (Parikh *et al.*, 2018). Una combinación en consorcio de diferentes géneros microbianos con actividad antifúngica permitiría la formulación de productos más versátiles y que se adapten mejor a las diferentes condiciones de cultivo, manteniendo el potencial biocontrolador (Raupach y Kloepper, 1998). Por tal motivo, en este trabajo se evaluó la actividad antagonista mediante aplicación combinada de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. como biocontroladores de *Fusarium* sp. a nivel de invernadero en uchuva (*Physalis peruviana* L.) con el fin de proponer estrategias adicionales en el control de enfermedades fúngicas de los cultivos de esta fruta.

MATERIALES Y MÉTODOS **2**

Aislamiento de microorganismos

Se recolectaron 200 g de suelos de la rizosfera en dos cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L), uno de la vereda Pantallio del municipio de La Unión, Antioquia (5°58'52.68"N 75°24'37.08"W) y otro sobre la vía La Unión, Sonsón (5°57'32.4"N 75°19'48"W). Las muestras se obtuvieron a una profundidad entre 0 y 20 cm cerca de las raíces, tanto de plantas de uchuva sanas como de plantas con signos de infección por *Fusarium* sp., evidenciada por presencia de hojas amarillas y marchitas, tallos flácidos y caídos, necrosis leve y poco desarrollo foliar. Todas las muestras se transportaron refrigeradas en bolsas de polietileno. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una suspensión preparada agitando 50 g de suelo en 50 ml de agua destilada durante 30 min. Las diluciones entre 10^{-3} y 10^{-8} se sembraron por triplicado en Agar Triptona Soya (TSA) y en Agar Papa Dextrosa (PDA) para el aislamiento de bacterias y hongos, respectivamente.

Se recolectaron además cinco muestras de material vegetal como hojas y tallos con los síntomas de infección por *Fusarium* sp. mencionados, las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% v/v durante 1 min y lavados con agua destilada estéril; se cortaron en fragmen-

tos de 0.5 cm y tres de cada tejido se incubó sobre Agar Rosa de Bengala (polipeptona micológica 5.0 g/L, glucosa 10 g/L, sulfato de magnesio 0.50 g/L, fosfato potásico 1 g/L, rosa de Bengala 0.06 g/L, cloranfenicol 0.20 g/L y agar-agar 15 g/L a pH 7) para el aislamiento de *Fusarium* sp. a partir del material vegetal.

Todos los medios (TSA, PDA y Rosa de bengala) se incubaron a temperatura ambiente durante 2 días para el aislamiento de bacterias y 8 días para la obtención de *Fusarium* sp. Los aislamientos TV1 (*T. reesei*) y TV2 (*Trichoderma* sp.) utilizados en este estudio fueron donados por la I.U. Colegio Mayor de Antioquia.

Se comprobaron los rasgos morfológicos de los hongos mediante observaciones microscópicas con azul de lactofenol aplicando claves taxonómicas para su identificación preliminar (Barnett y Hunter, 1998). Se confirmó el aislamiento de bacterias formadoras de endosporas por tinción de Gram y con verde de malaquita.

Antagonismo in vitro

Para evaluar la actividad inhibitoria de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium* sp. se realizaron enfrentamientos duales por triplicado en PDA, para esto se ubicaron discos de 0.5 cm de diámetro con micelio de am-

bos hongos a una distancia entre sí de 7 cm. Los hongos provenían de cultivos de 7 días de incubación a temperatura ambiente en PDA. Estos ensayos se incubaron a 28 °C durante 7 días.

Los enfrentamientos duales entre *Bacillus* sp. y *Fusarium* sp. se realizaron por triplicado en PDA; se ubicó un disco con el hongo en el centro de la caja y se inocularon cuatro aislados bacterianos en estrías, cada una a 3 cm del hongo. En este caso, las bacterias provenían de un cultivo en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 24 horas de crecimiento a 37 °C, dichos ensayos se incubaron a 28 °C durante 7 días.

Se midió el crecimiento de las colonias y se determinó la capacidad de los aislados mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%I) del patógeno, siguiendo el modelo matemático utilizado por Gautam *et al.* (2015) (Ecuación 1), en el que %I es el porcentaje de inhibición micelial, T el diámetro con crecimiento micelial influenciado y C el diámetro con crecimiento micelial libre.

$$\%I = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Prueba de patogenicidad

Se desinfectaron semillas comerciales de uchuva (Fercon®) en hipoclorito de sodio al 2% v/v durante 5 minutos y se lavaron tres veces con agua destilada estéril; se ubicaron 15 semillas por tratamiento, cin-

co por caja de Petri con papel filtro, a una humedad relativa del 95% y se inocularon con 5 ml de una suspensión de 1×10^6 conidios/ml ajustado en cámara de Neubauer, con cada uno de los hongos patógenos a evaluar. Las semillas se incubaron durante 15 días a temperatura ambiente y fotoperiodo 12 horas luz/ 12 horas oscuridad. Se determinó la presencia de micosis sobre la semilla o radícula usando el porcentaje de germinación (%G) bajo el modelo matemático de Gautam *et al.* (2015) (Ecuación 2), además se midió con una regla graduada la longitud radicular de las plántulas para cada tratamiento.

$$\%G = \frac{\text{Número de semillas germinadas}}{\text{Número total de semillas}} \times 100$$

(Ecuación 2)

Actividad antagónica en condiciones de invernadero

Se sembraron plántulas de uchuva (Fercon®) de menos de tres meses de edad y obtenidas sin aplicación de agroquímicos, en bandejas con turba y cascarilla de arroz estéril mezcladas en proporción 50:50. Las plantas durante todo el ensayo se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con luz natural, un fotoperiodo 12 horas luz/ 12 horas oscuridad, temperatura promedio de 25°C, un riego cada tres días con agua destilada estéril y por planta se adicionó una solución de Hoagland cada 15 días preparada de acuerdo a Realpe Ortiz *et al.* (2006). Para esta prueba se seleccionó el hongo que causó la mayor

reducción en la germinación y como biocontroladores se evaluaron un aislado de *Bacillus* sp. y uno de *Trichoderma* sp. con inhibiciones *in vitro* superiores al 45%.

Se aplicaron nueve tratamientos a las plantas como se muestra en la Tabla 1, para cada uno se contaba con cinco unidades experimentales ubicadas de forma aleatoria en cada bandeja y la inoculación del patógeno se realizó cinco días después de adicionar los biocontroladores. El proceso de inoculación se realizó con 1×10^6 conidios/ml del hongo patógeno y/o 1×10^8 conidios/ml o UFC/ml de los

biocontroladores según cada tratamiento. La concentración se ajustó en cámara de Neubauer para los conidios fúngicos, con un patrón McFarland 0.5 para las células bacterianas.

Tres meses después de iniciar la inoculación, se determinó la longitud, el peso fresco y seco del área foliar (tallo), radicular (raíz) y de la plántula y el número de hojas; adicionalmente, se realizó un reaislamiento de los microorganismos en PDA y agar nutritivo con el fin de verificar la presencia de los microorganismos inoculados en cada tratamiento.

■ **Tabla 1.** Tratamientos aplicados para la evaluación de la actividad antagonista en condiciones de invernadero de *Bacillus* sp., *Trichoderma* sp. y su actividad conjunta frente a *Fusarium* sp.

Tratamientos aplicados	Descripción
1) Control negativo	Plántulas sin infectar con adición de agua destilada
2) Control químico	Plántulas infectadas con <i>Fusarium</i> sp., tratadas con fungicida químico comercial Control 500® de acuerdo con las especificaciones de la etiqueta
3) Control de infección	Plántulas infectadas con <i>Fusarium</i> sp. adición de agua destilada
4) Tratamiento <i>Bacillus</i> sp.	Plántulas no infectadas, tratadas con bacteria controladora (<i>Bacillus</i> sp.)
5) Tratamiento <i>Trichoderma</i> sp.	Plántulas no infectadas, tratadas con hongo controlador (<i>Trichoderma</i> sp.)
6) Tratamiento en consorcio.	Plántulas no infectadas, tratadas con el consorcio bacteria hongo (<i>Bacillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.).
7) Tratamiento <i>Fusarium</i> sp. y <i>Bacillus</i> sp.	Plántulas infectadas con <i>Fusarium</i> sp., tratadas con bacteria controladora (<i>Bacillus</i> sp.)
8) Tratamiento <i>Fusarium</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.	Plántulas infectadas con <i>Fusarium</i> sp., tratadas con hongo controlador (<i>Trichoderma</i> sp.)
9) Tratamiento <i>Fusarium</i> sp. y consorcio.	Plántulas infectadas con <i>Fusarium</i> sp., tratadas con el consorcio bacteria – hongo (<i>Bacillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.).

Fuente: autores.

Extracción del DNA y amplificación de la región ITS

Se realizó la identificación molecular del hongo con mayor índice de patogenicidad. Para esto se cultivaron los hongos en caldo Sabouraud a temperatura ambiente durante 5 días; el micelio obtenido se maceró en nitrógeno líquido y se adicionaron 700 μl de buffer CTAB 2X a 65°C y cuatro μl de β -mercaptoetanol. Después de incubar a 65 °C durante 45 min se adicionaron 700 μl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se recuperó el sobrenadante después de centrifugar a 12000 rpm por 20 min. Se agregaron 700 μl de cloroformo y después de centrifugar se adicionó un volumen de isopropanol incubando a -20 °C durante 1 hora. Luego de centrifugar nuevamente, se realizaron varios lavados del pellet con etanol y finalmente se resuspendió en 50 μl de agua ultrapura estéril (Calle, 2017). La amplificación de la región Internal Transcribed Spacer (ITS, por sus siglas en inglés) se realizó por PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). La reacción se realizó en un volumen de 30 μl que contenía buffer 1X, 1.5 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de dNTPs, 0.2 μM de cada cebador, 50-100 ng/ μl de ADN blanco y una U de Taq polimerasa, con 30 ciclos de un min a 94 °C, un min a 50 °C y un min a 72 °C, seguidos por otra incubación a 72 °C por cinco min.

Por otro lado, para la identificación del aislado bacteriano con mayor actividad antagónica, se extrajo ADN a partir de un cultivo en caldo BHI utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Prome-

ga Corporation, Wisconsin, USA) según las instrucciones del fabricante. La amplificación por PCR del gen ARNr 16S se realizó con los cebadores universales 27f y 1492r (Heuer *et al.*, 1997). La reacción se realizó en 50 μl consistente en buffer 1X, 2 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de dNTPs, ocho μM de cada cebador, 50-100 ng/ μl de ADN blanco y 1.25 U de Taq polimerasa, con 30 ciclos de 1 min a 94 °C, un min a 52 °C y un min a 72 °C, seguidos por otra incubación a 72 °C por cinco min (Lane, 1991).

La cuantificación y calidad del ADN se realizó en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) y la integridad del ADN, así como la presencia de productos de PCR, se confirmaron en gel de agarosa 1.5% con EZ-Vision® In-Gel Solution 10000X (VWR) y visualización en luz ultravioleta. Estos últimos se purificaron usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega) y se secuenciaron utilizando los respectivos cebadores, esto se realizó en unABI-3500 automatizado utilizando el kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Identificación y análisis filogenético

Inicialmente, se verificó la calidad y nitidez de todos los electroferogramas, a partir de secuencias Forward y Reverse, seguidamente, las secuencias fueron alineadas y cortadas utilizando el software Geneious v10.0.9 (Kearse *et al.*, 2012). Luego, las secuencias se sometieron a

una búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para verificación y comparación con las disponibles en GenBank (Madden *et al.*, 1996) y finalmente todas las secuencias congéneres que tenían más del 96% de identidad se descargaron e incluyeron en el conjunto de datos final para delimitación de especies. Como grupo externo se utilizaron las especies *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* de GenBank. Para ello, se realizó una inferencia filogenética bayesiana utilizando BEAST 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012) bajo un reloj estricto bayesiano, con un modelo de evolución molecular HKY+I para aislado bacteriano, HKY para el hongo con mayor índice de patogenicidad y el hongo controlador con mayor actividad antagónica obtenido por jModel test v2 (Darriba *et al.*, 2012), con modelo de especiación Birth Death. Los análisis se realizaron con 100 millones de generaciones según el método de Monte Carlo basado en cadenas de Markov (MCMC), iniciado con un árbol aleatorio. Los árboles y las estimaciones de tiempo se tomaron cada 50000 generaciones, para un total de 5000 de árboles, los demás parámetros fueron analizados siguiendo la configuración pre-determinada construido en el complemento BEAUti de la misma versión. Después, se verificó la convergencia del corrido en TRACER (Rambaut *et al.*, 2018). A través de los valores de los tamaños de muestra efectivos (ESS) >200 de cada parámetro. Se utilizó TreeAnnotator (Drummond y Rambaut, 2007) para descartar el 10% de las lecturas (*burn in*) y crear un árbol ultramétrico de clado máximo con probabilidades posteriores de nodos, tiempos de

divergencia promedio, e intervalos de credibilidad del 95.

Después, se llevó a cabo una delimitación de especies de locus único (SLSD) en R 3.4.1 (R Development Core Team, 2014), siguiendo los modelos locmin, gmyc, y bgmyc, según lo propuesto por Machado *et al.* (2018). El enfoque de optimización del umbral de distancia y agrupación calculado por locmin, se realizó con el paquete spider_1.5.0 (Brown *et al.*, 2012); por otro lado, los análisis gmyc y bgmyc se desarrollaron en dos fases, la primera consta de una estimación puntual apoyada del árbol de máxima credibilidad antes formado en TreeAnnotator y la segunda a partir de intervalos de confianza determinados a partir de la probabilidad posterior de 1000 árboles, todo calculado mediante los paquetes bgmyc_1.0.2 (Reid y Carstens, 2012), splits_1.0-19 (Fujisawa y Barraclough, 2013), y ape_5.4 (Paradis, Claude y Strimmer, 2004). Por último, los resultados se visualizaron utilizando el paquete ggtree 3.0.1 (Yu *et al.*, 2017).

Análisis estadístico

Para analizar la actividad antagonista según el porcentaje de inhibición causado por las bacterias, se implementó un diseño completamente aleatorio (DCA) con tres réplicas, y se aplicaron una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis) y una comparación entre parejas para determinar las diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre los aislados. De igual forma, a fin de analizar la inhibición causada por *Tricho-*

derma sp., se realizó un DCA y se aplicó una prueba de t-student con el propósito de identificar diferencias en los porcentajes de inhibición. Para determinar los efectos de los tratamientos en condiciones de invernadero sobre las variables germinación de semillas, número de hojas, peso fresco, peso seco, longitud foliar y longi-

tud radicular se implementó un análisis de varianza de una vía y una prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) para comparación múltiple de medias, utilizando el software estadístico IBM SPSS 25®. Previamente, se confirmó la normalidad con la Prueba de Shapiro Wilk e independencia de varianzas con la prueba de Levene.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de microorganismos

Se aislaron 21 bacterias con morfología microscópica bacilar sin agrupación, Gram positivos, esporulados, con características consistentes con el género *Bacillus* (Zeigler y Perkins, 2021). De las muestras obtenidas de las rizosferas del cultivo de uchuva ubicado en la vereda

Pantallio, tanto de suelos de plantas sanas como de plantas sintomáticas, se logró el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* spp., dicho comportamiento no se evidenció para las muestras colectadas en la vía La Unión, Sonsón, ya que, para este caso, solo fue posible aislar microorganismos de este género a partir de la rizosfera con plantas sanas (Tabla 2).

■ **Tabla 2.** Codificación de los aislados consistentes con *Bacillus* sp. obtenidos a partir de la rizosfera de plantas de uchuva sanas y sintomáticas

Plantas	Vereda Pantallio	Vía La Unión - Sonsón
Sanas	S1, S3, S4	UC151, UC152, UC252, UC352, UC353, UC452, UC453, UC455, UC261
Con marchitez vascular	IA1, IA2, IA3, IB1, IB3, IB4A, IB4B, IB4C, IB5	NR

NR: no recuperados. **Fuente:** autores.

De acuerdo con la literatura, la diversidad bacteriana suele ser significativamente mayor en las plantas sanas que en las afectadas por fitopatógenos (Zhou *et al.*, 2021), lo que estaría de acuerdo con este estudio para las muestras colectadas en la vía La Unión, Sonsón. No obstante, no siempre ocurre de la misma manera. Jamil *et al.* (2022) y Liu *et al.* (2014), indicaron que un suelo saludable no siempre está asociado con una alta diversidad bacteriana; sin embargo, la presencia de *Fusarium* spp. en la rizosfera induce un aumento en los exudados de las plantas lo que le permite establecer interacciones con los pocos o muchos microorganismos controladores presentes en el suelo y activar sus mecanismos de acción.

En este estudio, a partir de las diferentes muestras del material vegetal colectado se obtuvieron tres aislados de *Fusarium* sp., dos del cultivo ubicado en **vía La Unión**, Sonsón (UCMV12, UCMV21) y uno de Vereda Pantalio (FVP22). Estos aislados en PDA presentaron micelio veloso de color blanco y con coloración púrpura en el reverso de la caja después de una semana de incubación y macroconidios en forma de medialuna, hialinas y septadas que según diferentes claves taxonómicas permiten confirmar el género de estos hongos (Barnett y Hunter, 1998; Rentería-Martínez *et al.*, 2018). Al igual que en este trabajo, algunos estudios han demostrado que los hongos del género *Fusarium*, especialmente *F. oxysporum*, presentan la mayor incidencia en plantas sanas o sin síntomas de marchitez en cultivos de uchuva de otras regiones del país, además se reportan coleccio-

nes que reúnen más de 136 aislamientos de esta especie (Simbaqueba *et al.* 2021; Tolosa-Moreno *et al.*, 2020).

Antagonismo *in vitro*

Se confirmó que diferentes aislados del género *Bacillus* inhiben el crecimiento de *Fusarium* sp. Donde siete de estos (33.33%) presentaron actividad antagónica contra los tres aislados FVP22, UCMV12 y UCMV21. El patógeno que mostró mayor susceptibilidad y que fue inhibido por el 90% de los aislados bacterianos fue FVP22, con los mayores porcentajes de inhibición causados por IB4B y UC453 con valores de 29.82 ± 4.34 y 30.53 ± 5.49 % respectivamente (Tabla 3). Por otro lado, UCMV21 fue el hongo inhibido por menos aislados bacterianos, aunque los máximos porcentajes de inhibición en este estudio se alcanzaron contra este hongo por parte de los aislados IB4A y IB4B (48.42 ± 1.82 %).

Los resultados demuestran que el aislado bacteriano con mayores porcentajes de inhibición fue IB4B coinciden con lo reportado por Vega-Torres *et al.* (2019), quienes alcanzaron inhibiciones *in vitro* de *Fusarium oxysporum* con *Bacillus* sp. entre 26 y 56 %, aunque fueron menores del 78% obtenido por Win *et al.* (2021), para uno de sus aislados de *Bacillus* sp. Según Constanza *et al.* (2011), IB4B sería un aislado como antagonismo medio (mostrando inhibición entre el 40 y 50 %) lo que indica que su actividad podría potenciarse con la inoculación simultánea de otros controladores a pesar de que este género bacteria-

no pueda presentar uno o más de los principales mecanismos de acción que evitan el establecimiento y desarrollo de organis-

mos fitopatógenos, como la excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas y toxinas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

■ **Tabla 3.** Inhibición de aislados consistentes con *Fusarium* sp. por antagonismo dual con aislados bacterianos del género *Bacillus*

Aislado	% Inhibición		
	UCMV12	UCMV21	FVP22
IA1	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	2.01 ± 3.47 ^c
IA2	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	9.02 ± 8.67 ^{bc}
IA3	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	7.77 ± 8.78 ^{bc}
IB1	4.23 ± 1.95 ^b	16.84 ± 1.82 ^a	13.53 ± 6.51 ^{bc}
IB3	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	6.02 ± 6.51 ^{bc}
IB4A	24.51 ± 7.04 ^a	48.42 ± 1.82 ^a	26.07 ± 2.17 ^a
IB4B	23.38 ± 5.16 ^a	48.42 ± 1.82 ^a	29.82 ± 4.34 ^a
IB4C	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	26.07 ± 5.74 ^a
IB5	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^c
S1	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	1.504 ± 1.3 ^c
S3	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^c
S4	16.62 ± 5.16 ^a	0 ± 0.0 ^b	9.77 ± 6.51 ^{bc}
UC151	15.38 ± 7.05 ^a	14.18 ± 0.0 ^a	28.14 ± 3.59 ^a
UC152	0 ± 0.0 ^b	2.68 ± 4.65 ^b	23.14 ± 6.05 ^b
UC252	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	18.56 ± 2.07 ^{bc}
UC352	23.08 ± 9.61 ^a	44.83 ± 1.62 ^a	26.95 ± 5.49 ^a
UC353	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	21.98 ± 4.03 ^b
UC452	0 ± 0.0 ^b	0 ± 0.0 ^b	28.14 ± 3.59 ^a
UC453	10.77 ± 2.66 ^a	0 ± 0.0 ^b	30.54 ± 5.49 ^a
UC455	25.80 ± 8.04 ^a	3.32 ± 4.20 ^b	14.99 ± 8.07 ^{bc}
UC261	3.07 ± 0.0 ^b	30.52 ± 3.54 ^a	11.38 ± 2.07 ^{bc}

En todos los casos los valores se expresan como el promedio ± desviación estándar. Los valores indicados con distinta letra para cada hongo patógeno difieren estadísticamente (p<0.05).

Fuente: autores.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición presentados por los hongos TV1 y TV2 para cada hongo patógeno; sin embargo, la máxima inhibición fue contra UCMV12 ($64.38 \pm 10.34 \%$) y la menor contra UCMV21 ($56.54 \pm 4.53 \%$) (Tabla 4). Estos resultados son similares a los reportados por Tsegaye Redda *et al.* (2018) quienes alcanzaron un rango de inhibición de *Fusarium oxysporum* del 29.72 ± 3.47 al 68.76% con 20 cepas diferentes del género

Trichoderma y a los presentados por Al-ani y Albaayit (2018), los cuales alcanzaron porcentajes de inhibición superiores al 50% contra *F. oxysporum* raza 4. Muchas especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente reportadas por su capacidad de producir compuestos antifúngicos que afectan indirectamente al crecimiento de los hongos patógenos, inducidos probablemente por la quitina de la pared celular de estos (Al-ani y Albaayit, 2018).

■ **Tabla 4.** Porcentaje de inhibición de los hongos consistentes con *Fusarium* sp. al enfrentarse con los aislados de *Trichoderma* sp.

Aislado	% Inhibición		
	UCMV12	UCMV21	FVP22
TV1	64.38 ± 10.34^a	43.70 ± 15.67^a	60.34 ± 5.97^a
TV2	58.22 ± 4.27^a	56.54 ± 4.53^a	63.22 ± 2.63^a

En todos los casos los valores se expresan como el promedio \pm desviación estándar. Los valores indicados con distinta letra para cada hongo patógeno difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

Fuente: autores.

Prueba de patogenicidad

Después de inocular las semillas de uchuva con los tres hongos patógenos evaluados (UCMV12, UCMV21 y FVP22) e incubarlas durante 15 días, se observó una disminución en el porcentaje de germinación y en la longitud radicular como resultado de la infección (Tabla 5). El aislado UCMV21 redujo la germinación de las semillas en un 58% y las raíces obtenidas en este tratamiento fueron las más cortas (0.4 cm), en comparación con el control

negativo (3.3 cm) (Figura 1). En todos los tratamientos excepto el control, se observó un micelio aéreo esponjoso y blanco sobre la superficie de la raíz (Figura 2). La patogenicidad de diferentes especies de *Fusarium* en semillas ya ha sido reportada, algunas cepas de *F. asiaticum* y *F. fujikuroi*, por ejemplo, causaron daños en semillas de soja evidenciados por la disminución del peso fresco y de la germinación de las semillas en casi 90% (Chang *et al.*, 2020), siendo estos aislamientos mucho más patógenos que los analizados en el presente

estudio. No obstante, en otro trabajo se encontraron reducciones del 40-66% en la germinación de semillas de sésamo al inocularlas con *F. proliferatum* y reducciones del 16.5% en el vigor (Nayyar *et al.*, 2018), resultados más similares a los obtenidos en este estudio para el aislado UCMV21.

Las diferencias encontradas en la patogenicidad de los tres aislamientos de *Fusa-*

rium como patógeno hemibiotrófico, pueden deberse a los mecanismos de virulencia expresados de manera diferencial por cada uno y que incluyen la producción de enzimas que degradan la pared celular y la síntesis de micotoxinas, que les permite esquivar las vías de defensa de las plantas, evitar el desarrollo vegetal y causar la muerte de las células (Perincherry *et al.*, 2019).

■ **Tabla 5.** Porcentaje de germinación y longitud radicular de semillas de uchuva como evaluación de patogenicidad de cada *Fusarium* sp. aislado

Aislado	% Germinación	Longitud de la raíz (cm)
UCMV12	80.00 ± 1.33 ^a	0.93 ± 0.15 ^c
UCMV21	42.22 ± 0.10 ^b	0.40 ± 0.09 ^d
FVP22	86.67 ± 0.06 ^a	1.43 ± 0.10 ^b
Control	100 ± 0.0 ^a	3.27 ± 0.15 ^{ab}

En todos los casos los valores se expresan como el promedio ± desviación estándar. Los valores indicados con distinta letra para cada hongo patógeno difieren estadísticamente (p<0,05).

Fuente: autores.



Figura 1. Longitud de la raíz por tratamiento. **A)** Control negativo (3.27 ± 0.15 cm) **B)** FVP22 (1.43 ± 0.1 cm). **C)** UCMV21 (0.4 ± 0.09). **D)** UCMV12 (0.93 ± 0.15 cm)

Fuente: autores.



Figura 2. Observación por estereomicroscopio del crecimiento del hongo por tratamiento. A) FVP22 B) UCMV21 C) UCMV12. Para todos los casos, se observó un crecimiento micelial de los patógenos sobre la raíz emergente de la semilla

Fuente: autores.

Antagonismo en invernadero

De acuerdo con la escala de virulencia de Correll *et al.* (1986) en función de la gravedad de la enfermedad, el patógeno UCMV21 inoculado en plántulas de uchuva, se puede categorizar en nivel dos, siendo poco virulento y agresivo, ya que, luego de tres meses de estudio, las plántulas inoculadas únicamente con el patógeno (Control patógeno) desarrollaron pocos síntomas de marchitez vascular, presentándose una muy leve coloración púrpura en la raíz, una sutil decoloración de las hojas y un crecimiento deficiente identificado por las dimensiones más bajas según las pruebas biométricas de longitud para la raíz (5.8 cm), el tallo (19.6 cm) y la plántula (raíz + tallo = 25.4 cm) (Figura 3).

Esta baja patogenicidad y virulencia es opuesta a los esperado, ya que en la prue-

ba de patogenicidad en semilla se registró una disminución en la germinación, resultado que podría explicarse, dado que los hongos del género *Fusarium* pueden presentar mayor o menor agresividad, dependiendo del estadio de desarrollo de la planta (Chang *et al.*, 2020), lo que, para este estudio, indicaría que UCMV21 presenta una mayor incidencia de la enfermedad en estados de desarrollo prematuro de las plantas, limitando la germinación como se observó en la prueba de patogenicidad. A pesar de esto, las plántulas de los demás tratamientos permanecieron asintomáticas e indicaron que todos los tratamientos evaluados presentaron actividad biocontroladora frente a este aislado. El tratamiento combinado demostró ser el mejor en la variable longitud de raíz, con un valor de 30.6 cm, sin embargo, este no destacó en la longitud del tallo; posi-

blemente la combinación de ambos microorganismos genera la producción de fitohormonas que inducen la elongación de la raíz y retrasa el crecimiento del tallo

(Alcántara *et al.*, 2019). Los demás tratamientos no difieren estadísticamente entre sí con un $p < 0.05$ (Figura 3).

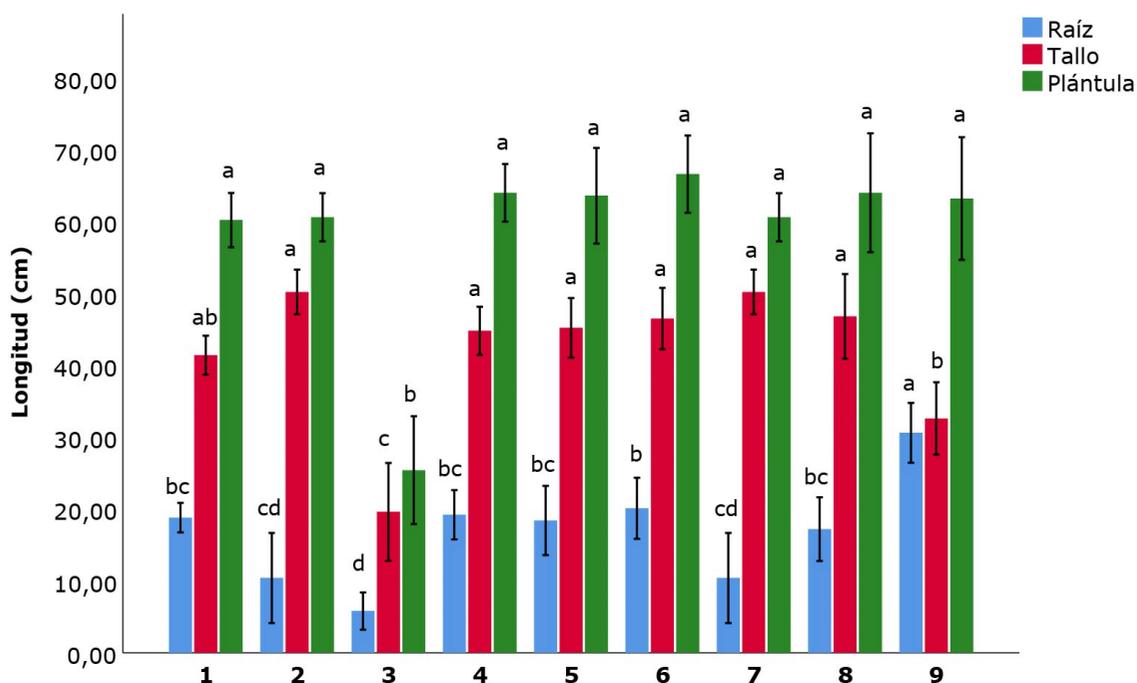


Figura 3. Longitud de la raíz, tallo y plántula por tratamiento. Los valores indicados con distinta letra difieren estadísticamente ($p < 0.05$). Cada variable respuesta fue analizada de manera independiente con respecto a los tratamientos 1 al 9 descritos y nombrados en la Tabla 1

Fuente: autores.

Para la variable de peso fresco de la raíz, solo el tratamiento con el patógeno (Control de infección) y el tratamiento con agua (Control negativo) presentaron diferencias significativas con valores de 0.14 y 1.46 gramos respectivamente (Figura 4). En el peso fresco del tallo y de la plántula, el control con el patógeno presentó los valores más bajos y difiere estadísticamente

con los demás tratamientos, los cuales no difieren entre sí, demostrando la disminución del crecimiento y desarrollo de la planta a causa del patógeno presente; entre tanto, en peso seco y número de hojas (cuyo conteo oscilo de 8 a 11 para todos los casos), ningún tratamiento presentó diferencias significativas, lo que indica que los tratamientos no influyen en la biomasa de

las plántulas sino en la longitud de estas, especialmente en la raíz (Figura 5).

Los biocontroladores, tanto de forma individual como en consorcio microbiano a la concentración inoculada, no mostraron efectos negativos sobre los parámetros biométricos medidos demostrando ser microorganismos benéficos lo que concuerda con lo reportado con Chaves-Gómez *et al.* (2021) y Zaim *et al.* (2018), quienes al aplicar aislados del género *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. obtuvieron buenos resultados, tanto en control biológico como para el desarrollo de las plántulas de uchuva y garbanzo respectivamente.

Aunque el tratamiento control con el patógeno en plantas no mostró todos los síntomas asociados al marchitamiento vascular, sí se evidenció la colonización de los haces vasculares, con lo fue posible reaislar los microorganismos inoculados de los tratamientos según correspondía. Es importante resaltar que para los tratamientos con *Fusarium* sp. y los biocontroladores se obtuvieron menos UFC del patógeno, en comparación con el tratamiento inoculado solo con el patógeno, demostrando que los microorganismos benéficos prevalecieron y proliferaron en el suelo durante todo el estudio.

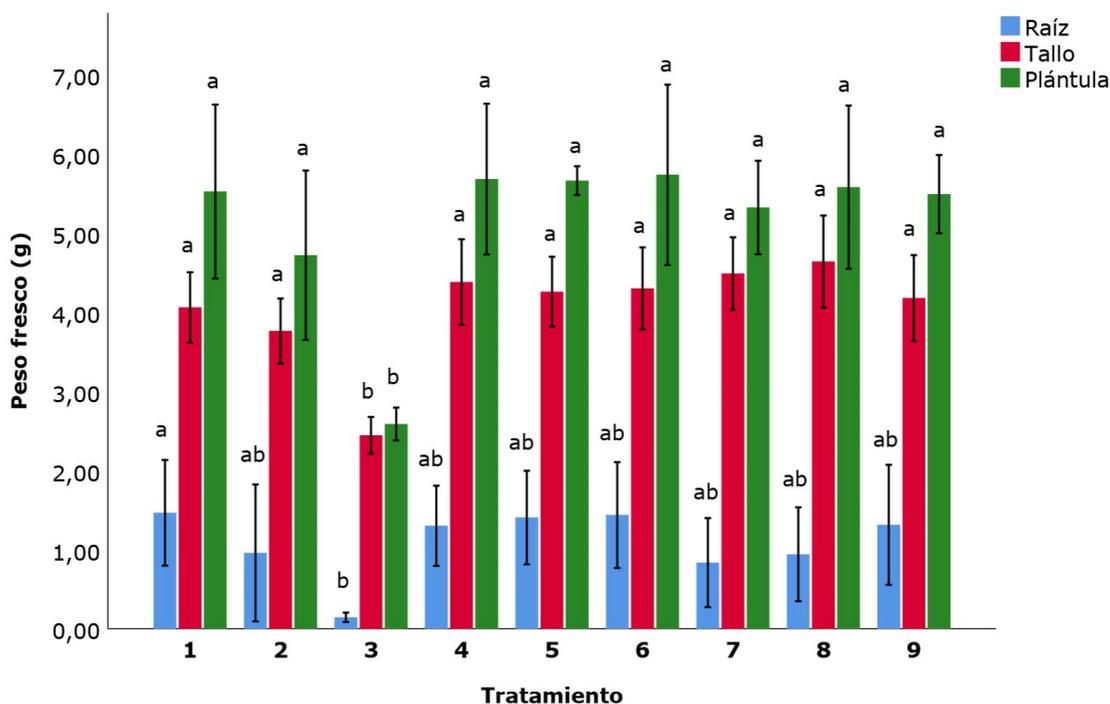


Figura 4. Peso fresco de la raíz, tallo y plántula por tratamiento. Los valores indicados con distinta letra difieren estadísticamente ($p < 0.05$). Cada variable respuesta fue analizada de manera independiente con respecto a los tratamientos 1 al 9 descritos y nombrados en la Tabla 1

Fuente: autores.

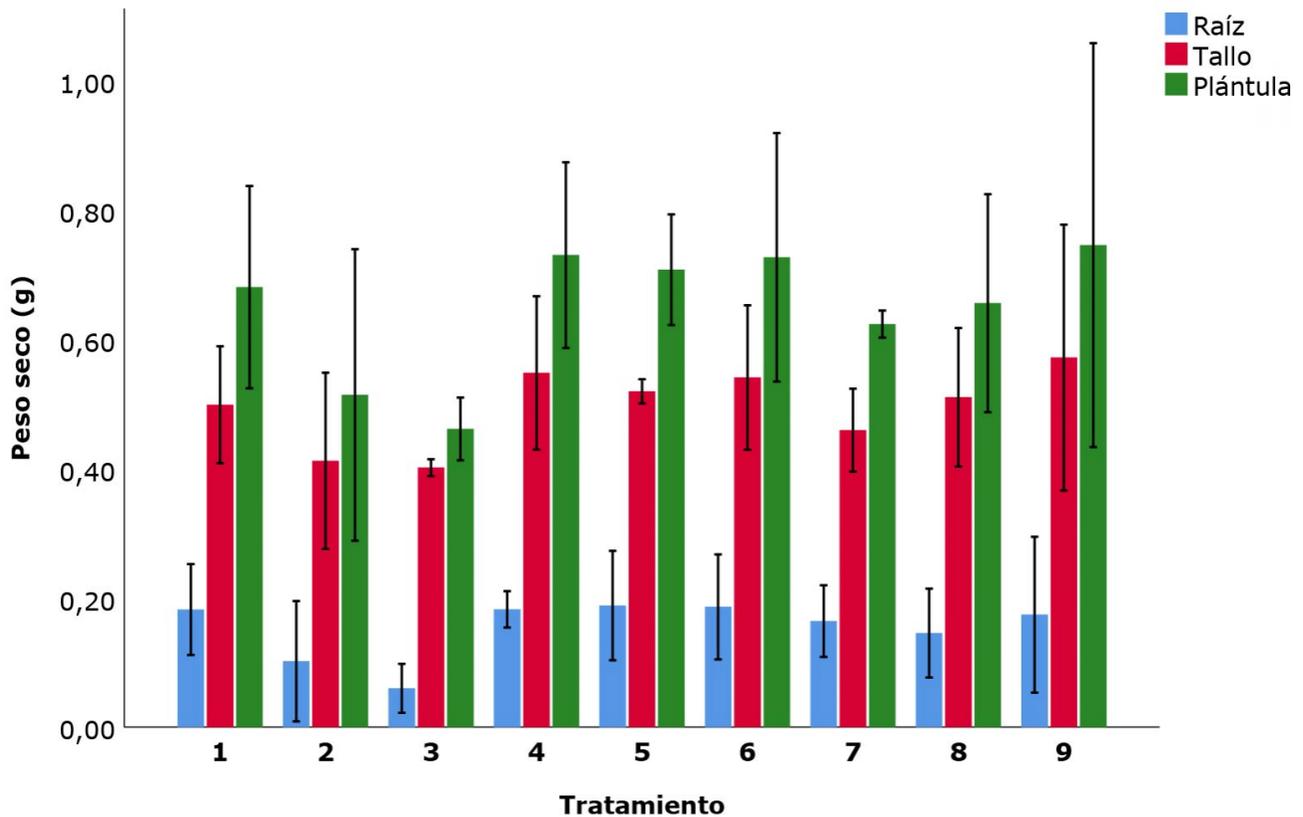


Figura 5. Peso seco de la raíz, tallo y plántula por tratamiento. Los valores indicados no presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$) por lo que todos se encuentran en un mismo grupo estadístico. Cada variable respuesta fue analizada de manera independiente con respecto a los tratamientos 1 al 9 descritos y nombrados en la Tabla 1

Fuente: autores.

Identificación y análisis filogenético

La identificación molecular solo se realizó para el aislamiento e IB4B, TV2 y UCMV21, ya que fueron los microorganismos que destacaron durante el estudio y con quienes se realizó el análisis de actividad antifúngica en condiciones de invernadero en plantas de uchuva. Para ello

se realizó la amplificación de regiones de DNA barcoding 16S para la bacteria e ITS para los hongos.

La alineación final del conjunto de datos de ARNr 16S consistió en 15 individuos, 12 especies nominales de *Bacillus* sp. y un grupo externo para enraizar el análisis (*Escherichia coli*). Del conjunto de datos de la región ITS de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. se hizo un análisis inde-

pendiente con 18 y 20 individuos, 13 especies nominales de *Fusarium* sp., 15 especies nominales de *Trichoderma* sp. y un grupo externo para enraizar el análisis el análisis (*Aspergillus niger*).

Los resultados del enfoque SLSD de IB4B mostraron estimaciones discordantes entre locmin, gmyc y bgmyc con tres, dos y cinco especies putativas, respectivamente (Figura 6). El análisis locmin optimizó un umbral de divergencia de 0.032 (distancia p) para el conjunto de datos, permitiendo la delimitación de tres especies putativas del género *Bacillus*. Ninguno de los tres métodos de delimitación de especies de locus único pudo delimitar la totalidad de las especies nominales de *Bacillus*, sin embargo, lograron diferenciar el género *Bacillus* del grupo control (*E. coli*), por lo cual el aislamiento obtenido en esta investigación es consistente con el género *Bacillus*, lo cual fue similar a lo identificado en BLASTn, dado que los aislamientos, coincidían con múltiples especies/cepas que mostraban puntuaciones de identidad y valores E iguales.

Estas dificultades de diferenciación filogenética entre especies del género *Bacillus* ya han sido reportada con anterioridad, debido a la naturaleza altamente conservada del gen 16S rRNA (Rooney *et al.*, 2009). Lo cual ha traído consigo un mal uso permanente en la descripción de importantes cepas de biocontrol de este género, como lo demuestra Fan *et al.* (2017) en su estudio, en el que muchos de los genomas de *Bacillus* sp. disponibles públicamente se encuentran asignados de manera inconsistente. De acuerdo con este autor, a menudo se designan como *B. subtilis* a microorganismos representantes de *B. velezensis* que simultáneamente pertenece al grupo operativo *B. amyloliquefaciens* comprendido por las especies de *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* y *B. siamensis*, que se encuentran estrechamente relacionada, tal y como se evidenció en el presente estudio, en el que los clados no están claramente diferenciados y no es posible determinar con exactitud la especie del aislado IB4B.

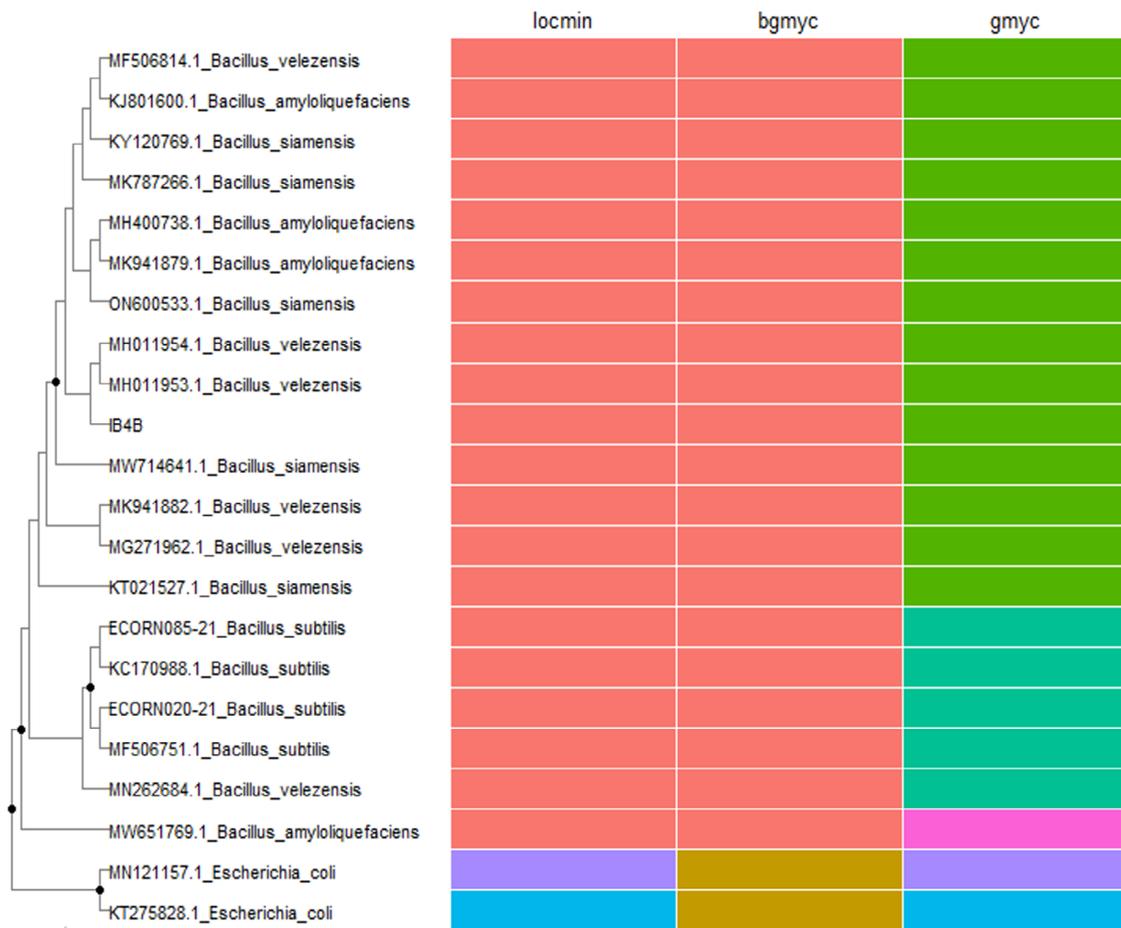


Figura 6. Árbol filogenético y análisis de delimitación de especie por locmin, gmyc y bgmyc para el aislado IB4B

Fuente: autores.

Por otro lado, en esta prueba, TV2 mostró estimaciones puntuales concordantes entre locmin y bgmyc con dos especies putativas; mientras que gmyc fue discordante con estos métodos, con seis especies putativas (Figura 7). El análisis locmin optimizó un umbral de divergencia de 0.195, por otro lado, solamente el método gmyc pudo delimitar la totalidad de las especies nominales y el grupo control, por lo cual TV2 es consistente con *Trichoderma asperellum*, esto fue similar a lo identificado en BLASTn, que mostraba una identidad del 98% con esta especie.

Los resultados concuerdan con los reportados por Gunaratna *et al.* (2019) quienes por análisis de la región ITS 1 y 4 lograron identificar dos aislados con actividad antagonista como *T. asperellum* y *T. virens* con más del 90% de similitud en comparación con las bases de datos y con la filogenia realizada por Kariuki *et al.* (2020) de tres aislados fúngicos identificados como *T. asperellum* y *T. harzianum*, demostrando la viabilidad de utilizar tales marcadores moleculares para la identificación correcta de estos aislados, tal y como se evidencia en la Figura 7.

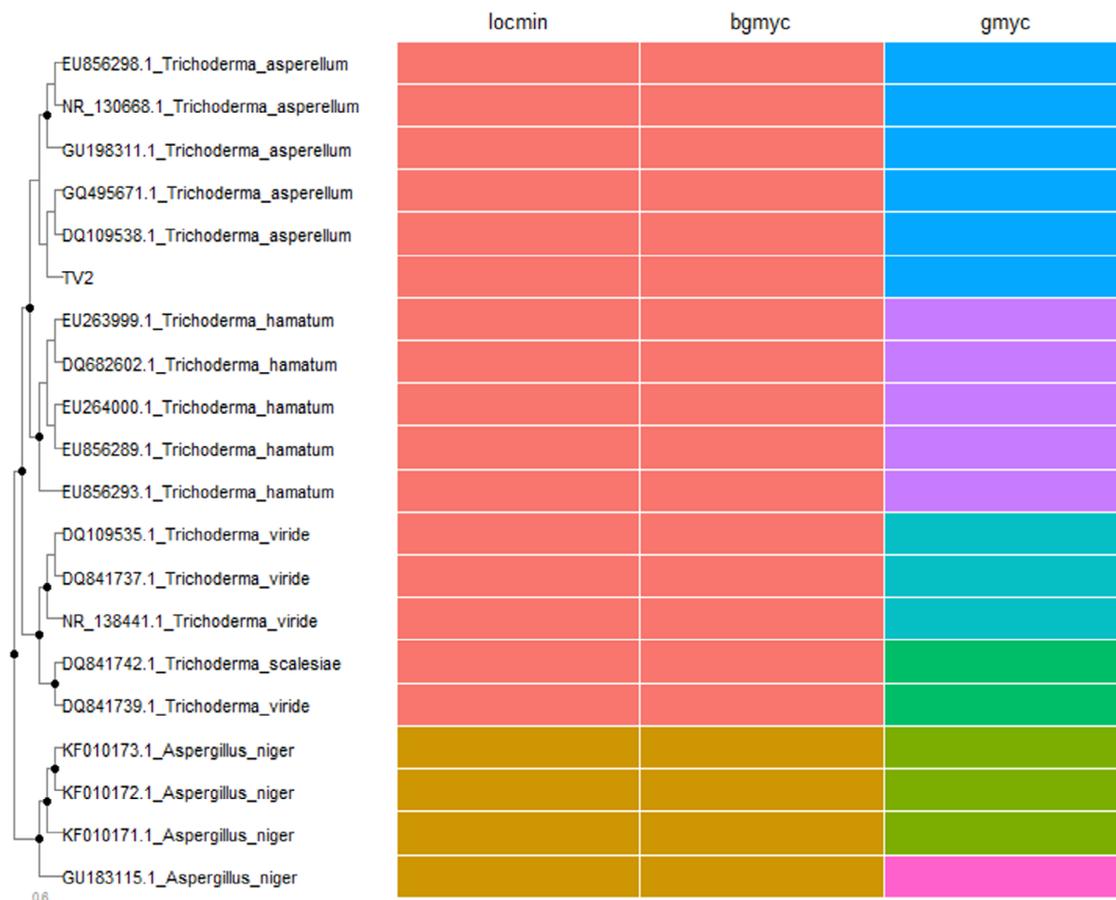


Figura 7. Árbol filogenético y análisis de delimitación de especie por locmin, gmyc y bgmyc para el aislado TV2

Fuente: autores.

Para UCMV21 los análisis mostraron estimaciones discordantes entre los tres métodos de delimitación con dos, tres y nueve especies putativas, respectivamente. El análisis locmin optimizó un umbral de divergencia de 0.217, permitiendo la delimitación de dos especies putativas del género *Fusarium* (Figura 8). Únicamente el modelo gmyc logró delimitar por completo las especies nominales del género, al igual que el grupo control (*A. niger*), clasificando a UCMV21 dentro del grupo nominal *Fusarium oxysporum*. Esto fue similar a lo identificado inicialmente en BLASTn, dado que los aislamientos, coincidían con

múltiples cepas con identidades entre el 85 y 90%. Al igual que con *T. asperellum*, las regiones ITS evaluadas, permitieron la identificación de *F. oxysporum* al igual que Bektast y Kusek (2019) quienes mediante los cebadores fúngicos universales ITS1 e ITS4 amplificaron con éxito para todas las cepas altamente virulentas con un 90% de similitud con *F. oxysporum* para los 41 aislados reportados, siendo esta región la más utilizada para estudios filogenéticos en *F. oxysporum*, debido a la especificidad de especie y por proporcionar mejores distinción a nivel de subespecies (Schoch *et al.*, 2012; Suga *et al.*, 2000).

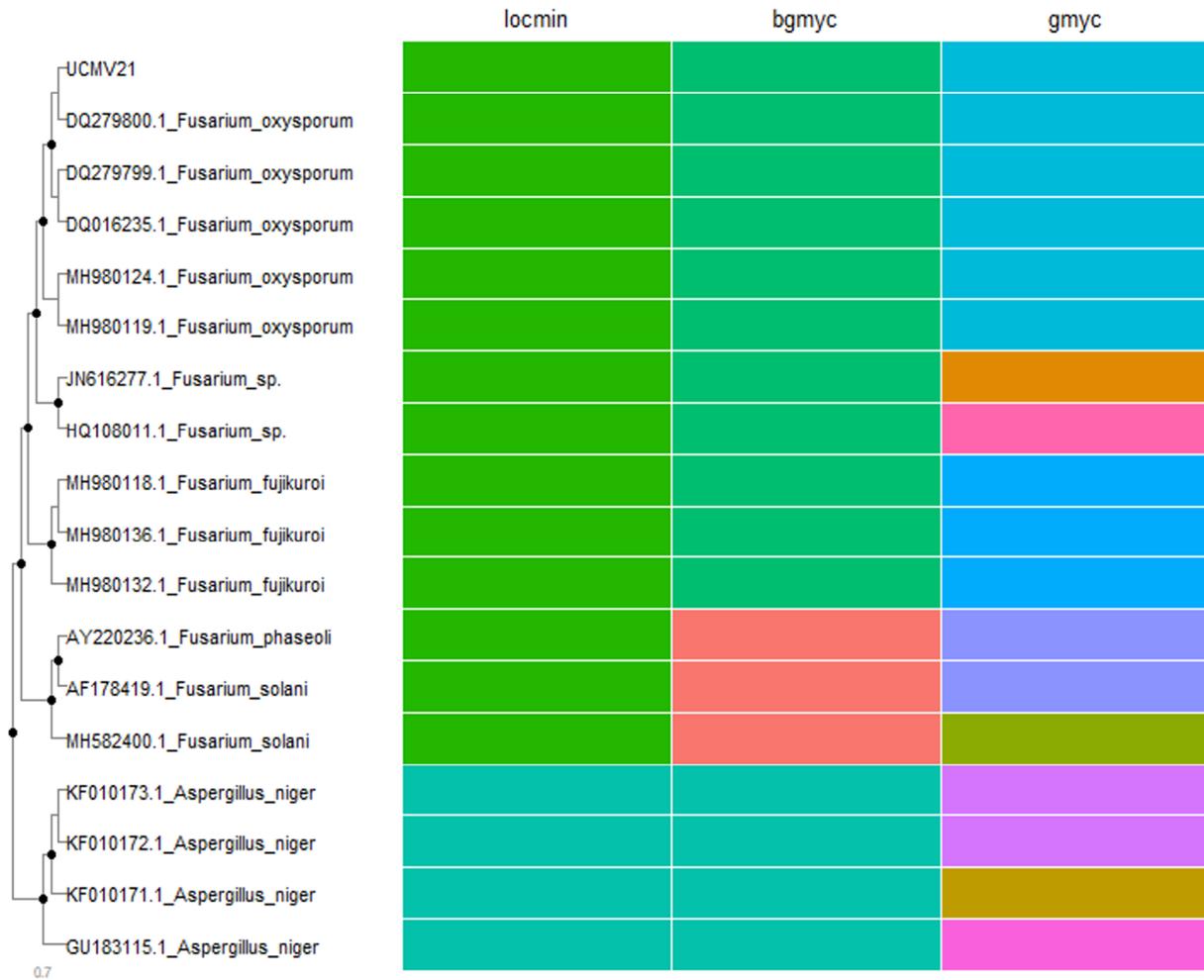


Figura 8. Árbol filogenético y análisis de delimitación de especie por locmin, gmyc y bgmyc para el aislado UCMV21.

Fuente: autores.

4 CONCLUSIONES

Se aislaron 12 bacterias del género *Bacillus* a partir de muestras de suelo de la rizosfera de plantas sanas y 9 de muestras de suelo de plantas con sintomatología de infección por *Fusarium* sp. Igualmente, se obtuvieron tres aislados del género *Fusa-*

rium a partir de muestras de material vegetal recolectado en los dos sitios de muestreo visitado. En este estudio se evidenció la actividad antagonista del aislado TV2 identificado como *Trichoderma asperellum* e IB4B (*Bacillus* sp.) frente a UCMV21 iden-

tificado como *Fusarium oxysporum*, un patógeno de semillas y plántulas de uchuva que según pruebas *in vitro* e *in vivo* redujo la germinación en un 58% en caja Petri y disminuyó los parámetros biométricos medidos en condiciones de invernadero. Tanto de forma individual como en consorcio microbiano, *T. asperellum* y *Bacillus* sp. mejoraron los parámetros biométricos de la planta, especialmente la longitud de

raíz de las plántulas, posiblemente por la producción de fitohormonas que serían de interés para un futuro estudio; adicionalmente, para confirmar la buena actividad reportada de los biocontroladores que se equipara estadísticamente con el control químico, es necesario nuevos análisis utilizando un *Fusarium* sp. mucho más patógeno y virulento que el estudiado.

CONTRIBUCIÓN DE LA AUTORÍA ■

Marcela Mora López: investigación, análisis de datos, conceptualización, escritura y borrador original. Ana María Ochoa Aristizábal: investigación, análisis de datos, escritura, revisión y edición. Víctor Manuel Osorio Echeverri: logística, revisión y edición.

AGRADECIMIENTOS ■

Los autores agradecen al personal de la Central de materiales del Laboratorio de Biotecnología y a la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia por el apoyo económico y logístico para

el desarrollo de este proyecto. Especialmente queremos agradecer a Alejandro Mejía por su colaboración en las pruebas moleculares.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, M., Dheeman, S., Dubey, R. C., Kumar, P., Maheshwari, D. K., and Bajpai, V. K. (2017). Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. *Microbiological Research*, 205, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.012>
- Al-ani, L. K. T., and Albaayit, S. F. A. (2018). Antagonistic of some *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum* sp. f. cubense tropical race 4 (FocTR4). *The Eurasia Proceedings of Science, Technology, Engineering & Mathematics (EP-STEM)*, 2, 35–38.
- Alcántara, J. S., Acero, J., Alcántara, J. D. y Sánchez, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.22490/24629448.3639>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anusha, B. G., Gopalakrishnan, S., Naik, M. K., and Sharma, M. (2019). Evaluation of *Streptomyces* spp. And *Bacillus* spp. For biocontrol of *Fusarium* wilt in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 52(5-6), 417-442. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1635302>
- Bakker, M. G., Brown, D. W., Kelly, A. C., Kim, H.-S., Kurtzman, C. P., McCormick, S. P., O'Donnell, K. L., Proctor, R. H., Vaughan, M. M., and Ward, T. J. (2018). *Fusarium* mycotoxins: a trans-disciplinary overview. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 161–171. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1433720>
- Barnett, H. L., and Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (Fourth ed). Burgess Publishing Company.
- Bazalar, M. S., Nazareno, M. A., and Viturro, C. I. (2019). Nutritional and Antioxidant Properties of *Physalis peruviana* L. Fruits from the Argentinean Northern Andean Region. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 68–75. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0702-1>
- Bektast, I., and Kusek, M. (2019). Phylogenetic and morphological characterization of *Fusarium oxysporum* F. Sp. Cepae the causal agent of basal rot on onion isolated from Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(3), 1733–1742. <https://www.researchgate.net/publication/332633592>

- Brown, S., Collins, R., Boyer, S., Lefort, M., Malumbres-Olarte, J., Vink, C., and Cruickshank, R. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12, 562–565. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>
- Calle, C. (2017). *Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos de Phytophthora cinnamomi obtenidos de huertos de aguacate del departamento de Antioquia, Colombia*. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/59932>
- Chang, X., Li, H., Naeem, M., Wu, X., Yong, T., Song, C., Liu, T., Chen, W., and Yang, W. (2020). Diversity of the Seedborne Fungi and Pathogenicity of *Fusarium* Species Associated with Intercropped Soybean. *Pathogens*, 9(7), 531. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070531>
- Chaves-Gómez, J. L., Chávez-Arias, C. C., Prado, A. M. C., Gómez-Caro, S., and Restrepo-Díaz, H. (2021). Mixtures of biological control agents and organic additives improve physiological behavior in cape gooseberry plants under vascular wilt disease. *Plants*, 10(10), 2059. <https://doi.org/10.3390/plants10102059>
- Choudhary, D. K., Prakash, A., and Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0054-2>
- Corrales-Bernal, A., Vergara, A., Rojano, B., Yahia, E. y Maldonado, M. (2015). Características nutricionales y antioxidantes de la uchuva colombiana (*Physalis peruviana* L.) en tres estadios de su maduración. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 65(4).
- Correll, J. C., Puhalla, J. E., and Schneider, R. W. (1986). Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. apii on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. *Phytopathology*. *Phytopathology*, 76, 396–400. <https://doi.org/10.1094/Phyto-76-396>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics, and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- de Lamo, F. J., and Takken, F. L. W. (2020). Biocontrol by *Fusarium oxysporum* Using Endophyte-Mediated Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00037>
- Díaz, A., Smith, A., Zapata, J. y Mesa, P. (2012). *Avances en el manejo y control de Fusarium oxysporum en el cultivo de uchuva (Physalis peruviana)*. Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA
- Drummond, A.J., and Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary anal-

- ysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., and Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Dwivedi, N., and Dwivedi, S. K. (2020). Soil Solarization: An ecofriendly technique to eradicate soil fusaria causing wilt disease in guava (*Psidium Guajava*). *International Journal of Fruit Science*, 20(sup3), S1765–S1772. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1833808>
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., and Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., and Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fischer, G., Almanza-merchán, P. J., and Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). *SciELO*, 36(1), 1–15. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>
- Fujisawa, T., and Barraclough, T.G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62, 707–724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>
- Gautam, S. S., Kanchan, K., and Satsangi, G. P. (2015). Effect of *Trichoderma* species on germination and growth of Mungbean (*Vigna radiata* L.) and its antagonistic effect against fungal pathogens. *Revista Internacional de Investigación Avanzada (IJAR)*, 3(2), 153–157.
- Granados, W., Muñoz, C. A. y Aguillón, D. M. (2019). *Cadena de la uchuva*. Ministerio de agricultura. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Pasifloras/Documentos/2019-06-30 Cifras Sectoriales UCHUVA.pdf>
- Gunaratna, L. N. R., Deshappriya, N., Jayaratne, D. L., and Rajapaksha, R. G. S. A. S. (2019). Damping-off disease of big onion (*Allium cepa* L.) in Sri Lanka and evaluation of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma virens* for its control. *Tropical Plant Research*, 6(2), 275–292. <https://doi.org/10.22271/tpr.2019.v6.i2.036>
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., and Wellington, E. M. (1997). Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8),

3233–3241. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997>

Hu, M., and Chen, S. (2021). Non-target site mechanisms of fungicide resistance in crop pathogens: A review. *Microorganisms*, 9(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030502>

Hudson, O., Fulton, J. C., Dong, A. K., Dufault, N. S., and Ali, M. E. (2021). *Fusarium oxysporum* f. sp. nivolum Molecular Diagnostics Past, Present and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9735. <https://doi.org/10.3390/ijms22189735>

Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 1, 14–21.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2022, mayo 17). Colombia es el mayor productor y exportador de Uchuva a nivel mundial. *Portal Corporativo ICA*. <https://www.ica.gov.co/noticiasica-colombia-mayor-productor-exportador-uchuvas#:~:text=445%2C%20y%20en%20toneladas%20aumentaron,y%20exportador%20de%20esta%20fruta>.

Islam, M. A., Nain, Z., Alam, M. K., Banu, N. A., and Islam, M. R. (2018). *In vitro* study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. *Egyptian Journal of Biologi-*

cal Pest Control, 28(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1>

Jamil, A., and Ashraf, S. (2020). Utilization of chemical fungicides in managing the wilt disease of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(17–18), 876–898. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1803705>

Kariuki, W. G., Mungai, N. W., Otaye, D. O., Thuita, M., Muema, E., Korir, H., and Masso, C. (2020). Antagonistic effects of biocontrol agents against *Phytophthora infestans* and growth stimulation in tomatoes. *African Crop Science Journal*, 28(s1), 55–70. <https://doi.org/10.4314/acsj.v28i1.5S>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., and Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kumari, M., Sharma, O. P., Sharma, K., Bagri, R., and Nathawat, B. (2020). Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. Lentis various systemic and non-systemic fungicides *in vitro*. *International Journal of Chemical Studies*, 8(5), 2717–2720. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i5ak.10729>

- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing, in: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 115-175). John Wiley and Sons.
- Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M., Nourollahi, K., Liu, X., and Kang, S. (2018). Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02614>
- Liu Y., Zhang N., Qiu M., Feng H., Vivanco J., Shen Q., et al. (2014). Enhanced rhizosphere colonization of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by pathogen infection. *FEMS Microbiol Lett*, 353(1), 49-56. Doi: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.1240>
- Machado, V.N., Collins, R.A., Ota, R.P., Andrade, M.C., Farias, I.P., and Hrbek, T. (2018). One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Scientific Reports*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26550-x>
- Madden, T. L., Tatusov, R. L., and Zhang, J. (1996). *Applications of network BLAST server*. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)66011-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)66011-X)
- Mayorga-Cubillos, F., Arguelles, J., Rodríguez, E., Almario, C., Ariza, C., and Barrero, L. (2019). Yield and physicochemical quality of *Physalis peruviana* L. Fruit related to the resistance response against *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali*. *Agronomia Colombiana*, 37(2), 120–128. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v37n2.77550>
- Mukhopadhyay, R., and Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Nayyar, B. G., Woodward, S., Mur, L. A. J., Akram, A., Arshad, M., Naqvi, S. M. S., and Akhund, S. (2018). Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds from the Punjab, Pakistan. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.02.001>
- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., and Stępień, Ł. (2019). *Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins*, 11(11), 664. <https://doi.org/10.3390/toxins11110664>
- Podgórska-Kryszczuk, I., Solarska, E., and Kordowska-Wiater, M. (2022). Biological Control of *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* by Antagonistic Yeasts. *Pathogens*, 11(1), 86. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010086>

- R Development Core Team. (2014). *R: A language and environment for statistical computing*.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., and Suchard, M.A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67, 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Raupach, G. S., and Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*®, 88(11), 1158–1164. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1158>
- Realpe, C. E., Villegas, C., and Riaño, N. M. (2006). Aislamiento y caracterización morfológica de *Rosellinia pepo* Pat. en plantas de macadamia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 59(2), 3509–3526.
- Rebollido, R., Martínez, J., Aguilera, Y., Melchor, K., Koerner, I., and Stegmann, R. (2008). Microbial populations during composting process of organic fraction of municipal solid waste. *Applied Ecology and Environmental Research*, 6, 61–67. https://doi.org/10.15666/aeer/0603_061067
- Rentería-Martínez, M. E., Guerra-Camacho, M. Á., Ochoa-Meza, A., Moreno-Salazar, S. F., Meza-Moller, A. D. C., and Guzmán-Ortiz, J. M. (2018). Description and comparison among morphotypes of *Fusarium brachygibbosum*, *F. falciforme* and *F. oxysporum* pathogenic to watermelon in Sonora, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-1>
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ehrhardt, C., Swezey, J. L., and Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2420–2436. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009126-0>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., and Miller, A.N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Simbaqueba, J., Rodríguez, E. A., Burbano-David, D., González, C., and Caro-Quintero, A. (2021) Putative novel effector genes revealed by the genomic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *physali* (Foph) that infects cape gooseberry plants. *Frontiers in Microbiology*, 11, 593915. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593915>
- Suga, H., Hasegawa, T., Mitsui, H., Kageyama, K. and Hyakumachi, M. (2000). Phylogenetic analysis of the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* based

- on the rDNA-ITS region. *Mycological Research*, 104(10), 1175-1183. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002719>
- Tolozá-Moreno, D. L., Lizarazo-Forero, L. M., and Uribe-Vélez, D. (2020). Antagonist capacity of bacteria isolated from cape gooseberry cultures (*Physalis peruviana* L.) for biological control of *Fusarium oxysporum*. *Tropical Plant Pathology*, 45(1). <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00313-z>
- Tsegaye Redda, E., Ma, J., Mei, J., Li, M., Wu, B., and Jiang, X. (2018). Antagonistic Potential of Different Isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. *European Journal of Experimental Biology*, 08(02). <https://doi.org/10.21767/2248-9215.100053>
- Vega-Torres, M. G., Ruiz-Cisneros, M. F., Pérez-Corral, D. A., Berlanga-Reyes, D. I., Ornelas-Paz, J. D. J., Rios-Velasco, C., Cambero-Campos, O. J., Estrada-Virgen, M. O., Luna-Esquivel, G. y Denise-Revérchon, F. L. (2019). Actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1), 57-64. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-3>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., and De los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Win, T. T., Bo, B., Malec, P., and Fu, P. (2021). The effect of a consortium of *Penicillium* sp. and *Bacillus* spp. in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1890-1908. <https://doi.org/10.1111/jam.15067>
- Yu, G., Smith, D.K., Zhu, H., Guan, Y., and Lam, T.T.-Y. (2017). ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 28-36. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>
- Zaim, S., Bekkar, A. A., and Belabid, L. (2018). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea *Fusarium* wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. ciceris. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(3-4), 217-226. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1447896>

Zeigler, D. R., and Perkins, J. B. (2021). The Genus *Bacillus*. En L. H. Green & E. Goldman (Eds.), *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003099277>

Zhou, X., Wang, J.-T., Wang, W.-H., Tsui, C. K., and Cai, L. (2021). Changes in

bacterial and fungal microbiomes associated with tomatoes of healthy and infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Microbial Ecology*, 81(4), 1004–1017. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01535-4>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.



Licencia de Creative Commons

Revista de Investigación Agraria y Ambiental is licensed under a Creative Commons Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional License.

