



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Bioprospección de bacterias rizosféricas aisladas de *Kalanchoe delagoensis* como agentes de biocontrol del marchitamiento fúngico del tallo y como mejoradoras del crecimiento vegetal

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el de

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

ING. ADRIANA EUNICE MARTINEZ ÁVILA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

NOVIEMBRE 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Bioprospección de bacterias rizosféricas aisladas de *Kalanchoe delagoensis* como agentes de biocontrol del marchitamiento fúngico del tallo y como mejoradoras del crecimiento vegetal.

Tesis

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

Ing. Adriana Eunice Martínez Ávila

Dirigido por:

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

SINODALES

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Presidente

Firma

Dr. Juan Campos Guillen
Secretario

Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
Vocal

Firma

Dra. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja
Suplente

Firma

M. en C. Aurora Mariana Alvarado
Suplente

Firma

Dr. José Santos Cruz
Director de la Facultad

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Director de Investigación y Posgrado

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Pérez', written in a cursive style.

RESUMEN

El “marchitamiento de tallo” de hortalizas es causado por distintas especies entre las que destacan *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, originando innumerables pérdidas económicas; en las últimas décadas se han incorporado métodos alternativos al control químico, como lo es el empleo de microorganismos con actividad de control biológico. El aislamiento de estos agentes de biocontrol se lleva a cabo de la rizósfera de especies cultivables de interés agrícola, subestimando el potencial de la ecología microbiana de otras plantas, como las invasoras, que pudieran además conferir a las plantas capacidades de adaptación a ambientes extremos. En el presente trabajo se realizó el aislamiento de bacterias rizosféricas de *Kalanchoe delagoensis*, las cuales fueron ensayadas mediante cultivo dual contra los fitopatógenos antes mencionados, de los cuales después de un ANOVA y una prueba de Tukey sobresalieron seis bacterias nombradas AEU, CEU, HEU, SEU, REU y PEU. Estas fueron secuenciadas por medio del gen 16S ARN ribosomal, encontrando que pertenecen al género *Peribacillus* (AEU) y *Bacillus* para el resto, con homologías desde el 98 al 99 %. Posteriormente, para evaluar el efecto de biocontrol, fue realizado un ensayo sobre germinados de tomate (*S. lycopersicum*), previamente inoculadas con la cepa de *Bacillus* PEU e infectadas con *Fusarium* sp. con una disminución de 22 % en el número de semillas inviables. Para el efecto promotor del crecimiento vegetal los aislados fueron inoculados en semillas de tomate (*S. lycopersicum*). Nuevamente destacó PEU aumentando en un 125 % el diámetro del tallo, un 142 % la altura, dicha promoción pudo ser debido a las propiedades bioquímicas de los aislados (como solubilización de fosfato, ácido indolacético, 1-aminociclopropano-1-carboxilato, fijación biológica de nitrógeno y producción de sideróforos), ya que, todos los aislados presentaron al menos una propiedad. Concluyendo, la rizósfera de *K. delagoensis* posee poblaciones microbianas de *Bacillus* con propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal, así como inhibición de fitopatógenos de interés agrícola, siendo objeto de estudios posteriores para determinar su amplio potencial como inoculante.

Palabras clave: Fitopatógeno, Control biológico, Planta invasora, Bacterias rizosféricas.

ABSTRACT

The “damping- off” of vegetables is caused by different species, among which *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani* stand out, originating innumerable economic losses; in the last decades, alternative methods to chemical control have been incorporated, such as the use of microorganisms with biological control activity. The isolation of these biocontrol agents is carried out from the rhizosphere of cultivable species of agricultural interest, underestimating the potential of the microbial ecology of other plants, such as invasive plants, which could also confer to plants the ability to adapt to extreme environments. In the present work, rhizospheric bacteria were isolated from *Kalanchoe delagoensis* and tested by dual culture against the aforementioned phytopathogens. After ANOVA and Tukey's test, six bacteria named AEu, CEu, HEu, SEu, REu and PEu stood out. These were sequenced by 16S ribosomal RNA gene, finding that they belong to the genus *Peribacillus* (AEu) and *Bacillus* for the rest, with homologies from 98 to 99 %. Subsequently, to evaluate the biocontrol effect, a trial was conducted on tomato (*S. lycopersicum*) sprouts, previously inoculated with the *Bacillus* PEu strain and infected with *Fusarium* sp. with a 22 % decrease in the number of non-viable seeds. For the plant growth promoting effect, the isolates were inoculated on tomato seeds (*S. lycopersicum*). Again, PEu increased stem diameter by 125 % and height by 142 %. This promotion could be due to the biochemical properties of the isolates (such as phosphate solubilization, indoleacetic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, biological nitrogen fixation and siderophore production), since all the isolates showed at least one property. In conclusion, the rhizosphere of *K. delagoensis* possesses microbial populations of *Bacillus* with biochemical properties related to the promotion of plant growth, as well as inhibition of phytopathogens of agricultural interest, being the subject of further studies to determine its broad potential as an inoculant.

Key words: Phytopathogen, Biological control, Invasive plant, Rhizospheric bacteria.

DEDICATORIAS

A mi mamá, sin ella no sería la persona quien soy ahora, siempre ha sido mi luz al final del túnel, quien me ha apoyado a seguir mis sueños desde niña, descubrir pasiones, cantar a todo pulmón, bailar cuando lo necesitas e intentar siempre ser feliz. Te amo con todo mi corazón mami.

A mi papá, siempre has sido mi ejemplo, me ha enseñado a ver con sus ojos, todo lo que uno puede hacer para no solo desenvolverse en la sociedad, sino que también ser agradecido, compartir, saber de dónde vienes para tener claro a dónde vas, te amo papá.

A Miguel, durante estos más de dos años ha sido la persona que está para mí, todos los días, a quien un día le platicue este sueño y dejando todo atrás ha caminado a mi lado, estoy agradecida por todo lo que me ha enseñado y como formamos una mini familia, que para mí es lo más bonito que tengo en este momento, Cricko, Lázaro, Frida y tú. Gracias por que siempre sentí que, durante cualquier caída, me sostendrías, por siempre en mis momentos con los sentimientos hechos bolita, estas para hacerme sentir mejor, gracias por tener convicciones tan parecidas a las mías, que en nuestros más grandes logros nos hemos sentido uno orgulloso del otro. Gracias porque sé que después de cada Huelum, habrá una segunda voz que siempre me acompañará. Te amo.

A mis hermanos, me han acompañado toda la vida, sin importar el camino que tomemos uno del otro, sé que siempre pueden ser mi refugio más grande, Adlai, me has alentado a seguir mis sueños y creer que puedo vencer todo, mucho más de lo que yo me he repetido a mí misma, gracias re igual; Aziel, eres mi hermanito, nunca habría llegado a donde estoy sin tu cariño, agradezco que tengamos el mismo humor, lo que me haces reír. Gracias a los dos por las risas sin sentido, los momentos de complicidad, las treguas, el acusarnos, solucionar nuestros problemas, hacerme segunda con las ocurrencias que salen de mi cabeza y ser mis compañeros de baile. Los amo mucho.

A mi Tía Mary, siempre has estado conmigo, en las buenas y en las muy malas, siempre has confiado en mí y estoy muy agradecida por la fe que me tienes, lo mucho que me amas y el yo siempre sentir que cuento contigo, has sido como una segunda mamá para mí. Te amo y gracias por apoyarme en este sueño.

Tiene una dedicatoria especial para mis abuelos, a mi abuelo Alfredo, por que siempre fui la niña de tus ojos y el orgullo que podrías estar sintiendo por mí en este momento; a mi abuelita María de Jesús, todos los días aparece un recuerdo de

ti en mi memoria y a mi abuelita María Elena, me cantaste las mañanitas por ultima vez cuando estaba sentada en una jardinera de la universidad, te volviste mi lugar feliz, al estar tan lejos de casa. Aunque falten esos pequeños detalles, el café en las mañanas, un pay de queso en navidad o el olor a dulce de leche, hay algo aquí que posiblemente no se pueda describir, ahí algo mío que se fue con ustedes y algo suyo que dejaron conmigo.

Gracias a mi FAMILIA, a toda mi FAMILIA, en especial a mi tía Elena, tío Enrique, Ana, Sebastián, Dani, Mateo, Brenda, tía Isabel, Chelo, Nena, tía José, Nicolas y Anahí, los amo mucho. Gracias por estar para mí, sus palabras de aliento, por sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba y apoyo incondicional, sin importar la distancia.

Gracias a la familia que me abrió las puertas de su casa, la señora Margarita, el señor Miguel, Diana, Karen, JuanMi y Eliud. Los quiero y siempre estaré agradecida.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) por el apoyo financiero para lograr la conclusión del trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el espacio brindado en esta institución.

A el Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar por la confianza, apoyo y ser la mente maestra detrás de este trabajo de investigación, su conocimiento brindado, la paciencia y el siempre estar dispuesto a dar lo mejor de si para con sus estudiantes.

A mis sinodales, Dr. Juan Campos Guillen, Dr. Aldo Amaro Reyes, Dra. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja y M. en C. Aurora Mariana Alvarado, por su apoyo durante la realización de este trabajo, los conejos y sus revisiones, gracias por todo.

A mis compañeros de trabajo Andrés, Ariadna, Mayra, Carlos, Fátima, María José, Paola, Mayeli, Alejandra, Andrea, Hernando y Fabian por su tiempo y dedicación en este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE CUADROS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
2.1 Importancia económica de las hortalizas.....	3
2.2 Plagas y enfermedades asociadas a hortalizas	5
2.3 “Damping- off”o Marchitamiento del Tallo	8
2.3.1 <i>Fusarium</i> sp.....	10
2.3.2 <i>Rhizoctonia solani</i>	12
2.3.3 <i>Phytophthora capsici</i>	14
2.3.4 Productos de síntesis química para el control del “damping- off”.	16
2.3.5 Productos sustentables para el control del “damping- off”	17
2.4 Perspectiva del género <i>Bacillus</i>	19
2.4.1 ¿Dónde encontrar a <i>Bacillus</i> ?	20
2.5 Plantas invasoras.....	22
2.6 <i>Kalanchoe delagoensis</i>	23
2.7 Actividad de promoción de crecimiento vegetal en cepas bacterianas	26
III. Objetivos.....	30
3.1 Objetivo General.....	30
3.2 Objetivos específicos	30
VI. Material y Métodos.....	31
4.1 Sitio de estudio	31
4.2 Material biológico.....	31
4.3 Obtención de aislados bacterianos.....	32
4.4 Capacidad de inhibición <i>In vitro</i>	33

4.4.1 Interacción dual entre hongos causantes del “damping- off” y aislados bacterianos	33
4.4.2 Ensayo en placa de agar sangre	35
4.5 Capacidad de biocontrol en germinados de semillas de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) por <i>Fusarium</i> sp.	35
4.8 Identificación de los aislados con actividad antagonista por secuenciación y análisis del gen 16S ARNr	38
4.6 Pruebas Bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal	39
4.6.1 Solubilización de fosfato.....	39
4.6.2 Producción de ácido indolacético.....	39
4.6.3 Actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC desaminasa)	40
4.6.4 Fijación biológica de nitrógeno.....	41
4.6.5 Producción de sideróforos.....	41
4.7 Promoción de crecimiento vegetal en plántula en condiciones de invernadero.....	42
4.9 Análisis estadístico.....	44
V. Resultados y discusión.....	45
5.1 Aislamiento de cepas bacterianas de <i>Kalanchoe delagoensis</i>	45
5.2 Propiedades de suelo rizosférico de <i>K. delagoensis</i>	48
5.3 Interacción dual <i>in vitro</i> entre hongos causantes del “damping- off”	49
5.3.1 Prueba de hemólisis.....	55
5.4 Identificación por 16S ARNr de los aislados con actividad antagonista y promotora del crecimiento vegetal.....	56
5.4 Promoción de crecimiento vegetal en plántula.	60
5.4.1 Pruebas Bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal.....	60
5.4.2 Promoción de crecimiento vegetal en plántula.	64
5.4 Ensayos de biocontrol de “damping- off” en germinados de semillas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>).	67
VI. Conclusiones.....	72

VII. Referencias.....73
IX.Anexos96

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales hortalizas producidas en México (SIAP, 2022b).	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica <i>Fusarium oxysporum</i>	11
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Rhizoctonia solani</i>	14
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora capsici</i>	16
Tabla 5. Clasificación taxonómica <i>Kalanchoe delagoensis</i>	25
Tabla 6. Solución nutritiva Steiner para riego de plantas de tomate (Magdaleno-Villar y col. 2006).	43
Tabla 7. Características morfológicas coloniales de los aislados bacterianos.	47
Tabla 8. Antagonismo <i>in vitro</i> de las cepas aisladas frente a <i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>Phytophthora capsici</i> y <i>Fusarium</i> sp.	48
Tabla 9. Características bioquímicas de los aislados bacterianos de la rizosfera de <i>Kalanchoe delagoensis</i>	53
Tabla 10. Evaluación de promoción de crecimiento vegetal de los diferentes aislados en plántulas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) a condiciones de invernadero.	57
Tabla 11. Características bioquímicas de los aislados bacterianos de la rizósfera de <i>Kalanchoe delagoensis</i>	63
Tabla 12. Evaluación de promoción de crecimiento vegetal de los diferentes aislados en plántulas de tomate (<i>S. lycopersicum</i>) a condiciones de invernadero.	66

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Ejemplos de hortalizas clasificadas de acuerdo con la FAO. Elaboración propia, con información recuperada de FAO (2023b).	3
Figura 2. Ejemplos de enfermedades en hortalizas por hongos, virus e insectos. .7	
Figura 3. Sintomatología de “damping- off”.	9
Figura 4. <i>Fusarium oxysporum</i>	10
Figura 5. <i>Rhizoctonia solani</i>	13
Figura 6. <i>Phytophthora capsici</i>	15
Figura 7. <i>Kalanchoe delagoensis</i> . Imagen obtenida de (Gajardo, 2023).	24
Figura 8. Algunas interacciones benéficas planta- PGPB.	26
Figura 9. Material biológico.....	32
Figura 10. Ensayo de cultivo dual para la determinación de actividad inhibitoria de bacterias sobre hongos.	34
Figura 11. Ensayo <i>in vitro</i> con semillas de jitomate (<i>S. lycopersicum</i>) y el fitopatgeno.....	36
Figura 12. Niveles de daño en germinados de semilla (el número indica el nivel de daño)	38
Figura 13. Imágenes obtenidas del microcultivo de <i>Fusarium</i> sp..	50
Figura 14. Efecto antagónico de cepas de <i>Bacillus</i> frente a <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i> , <i>P. capsici</i> y <i>Fusarium</i> sp. mediante ensayos duales.	54
Figura 15. Relación de placa de agar sangre y aislados bacterianos después de 24 h del sembrado.....	55
Figura 16. PCR= Producto de extracción de ADN de distintos aislados bacterianos, con marcador en 1,500 pb.....	57
Figura 17. Análisis filogenético de las bacterias encontradas en la zona rizosférica de <i>K. delagoensis</i>	61
Figura 18. Placas de medios selectivos.	62
Figura 19. Biocontrol de la severidad causada por <i>Fusarium</i> sp en semillas de tomate daño (n= 50 germinados).	68

Figura 20. Biocontrol en germinados de semilla de Q11 y el aislado PEu.71

I. Introducción

El damping-off también conocido como “ahogamiento o marchitamiento del tallo”, es una de las principales enfermedades de hortalizas que limitan su rendimiento en invernadero y en campo, impide la germinación de semillas o produce ahorcamiento en el tallo de la planta infectada (Lamichhane y col., 2017). Este padecimiento es generado por distintos tipos de hongos fitopatógenos entre estos se encuentran: *Phytophthora capsici*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Lo anterior, en términos socioeconómicos, causa pérdidas económicas para las y los productores (Cedillo- Portudal y col., 2023).

En este sentido, con el propósito de incrementar la productividad del sector agrícola y disminuir las pérdidas causadas por esta enfermedad, se ha implementado el uso de distintos fungicidas de síntesis química. Sin embargo, estos desencadenan problemas ambientales como el incremento de emisiones de compuestos entre estos, el óxido nitroso; la actividad agrícola es la principal emisora de este contaminante (Pereira- Goulart, 2022). Sin mencionar los problemas de lixiviación a aguas subterráneas, modificaciones en la estructura de suelo como el exceso de sales, pH, deterioro de microfauna, disminución de materia orgánica y, en consecuencia, daños a la salud humana por su empleo excesivo (Marzani y col., 2017).

Por otra parte, debido a la gran cantidad de energía que requiere su fabricación, este tipo de fungicidas constituyen el insumo con mayor componente energético de la producción agrícola, con el 1 % del consumo energético mundial. En México se destinó para el año 2020, 1,310 millones de pesos, con el objetivo de promover la utilización y acceso a insumos de nutrición para cultivos de esta índole (SIAP, 2022a).

En consecuencia, es fundamental encontrar soluciones que reduzcan u optimicen el uso de fungicidas de síntesis química. Cada vez hay más esfuerzos para desarrollar nuevas alternativas no contaminantes o de baja toxicidad y bajos

residuos que permitan el control de esta enfermedad, en comparación con el manejo de fungicidas sintéticos, en ese sentido, la bioprospección en la búsqueda de microorganismos que pudiesen ser útiles al tener potencial antagónico contra hongos fitopatógenos, siendo una opción para la mitigación de enfermedades como el damping-off (Rilling y col., 2019).

La ecología microbiana de los suelos muestra que las bacterias rizosféricas guardan una estrecha relación con la planta en la captación de nutrientes y defensa de esta, lo cual, favorece su desarrollo y es una opción para la sanidad de los cultivos agronómicos. Asimismo, es factible en cuanto a reproducibilidad e innovación (Azeem y col., 2022).

De esta forma, este proyecto se propuso explorar las poblaciones microbianas asociadas a la raíz de *K. delagoensis* con actividad antagónica contra distintos hongos fitopatógenos causantes del “marchitamiento del tallo”, en cultivos duales y en germinados de tomate (*S. lycopersicum*), así como cualidades como promotoras de crecimiento vegetal tales como ácido indolacético, sideróforos, ACC desaminasa, solubilización de fosfato, entre otras en medios selectivos, al igual que su evaluación en plántulas de tomate (*S. lycopersicum*).

II. Antecedentes

2.1 Importancia económica de las hortalizas

Las hortalizas son parte importante de la alimentación como fuentes de antioxidantes, provitaminas, vitaminas, azúcares digeribles, compuestos anti-colesterol, que aportan al cuerpo humano diferentes beneficios y regulan distintas funciones (Saavedra-Del Real y col., 2023).

Estas se pueden sembrar de forma directa en el terreno, o de forma indirecta en almácigo para después ser trasplantadas a suelo. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, por sus siglas en inglés FAO se clasifican por raíz, hoja, tallos y bulbos, flor o fruto FAO (2023b), algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.

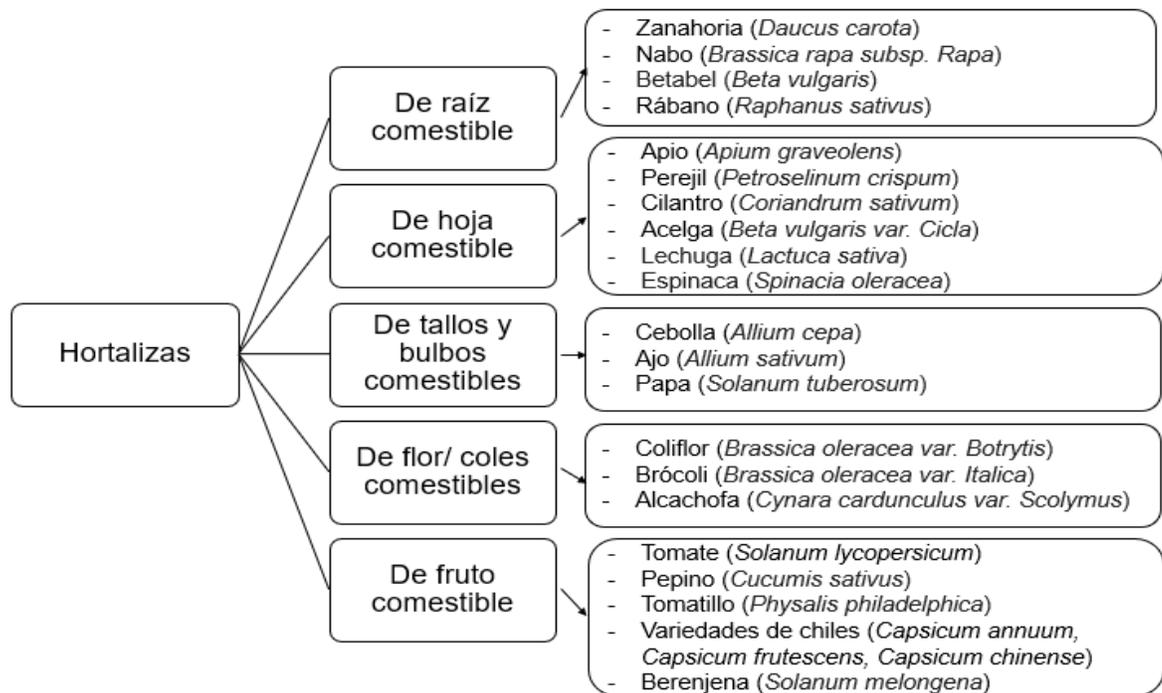


Figura 1. Ejemplos de hortalizas clasificadas de acuerdo con la FAO. Elaboración propia, con información recuperada de FAO (2023b).

Las hortalizas que se producen en mayor cantidad a nivel mundial son: tomate (*Solanum lycopersicum*), seguido por la cebolla (*Allium cepa*), pepino (*Cucumis sativus*), col (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), berenjena (*Solanum melongena*), zanahoria (*Daucus carota*), pimiento (*Capsicum annuum*), calabaza (*Cucurbita pepo*), lechuga (*Lactuca sativa*) y ajo (*Allium sativum*) (SIAP, 2022b). El Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) señala que México es uno de los diez países principales productores de estas hortalizas (CEDRSSA, 2023).

En tal sentido, de acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), para el año 2021, México produjo 14.1 millones de toneladas de hortalizas, motivo por el cual, fue considerado el noveno productor a nivel mundial (SIAP, 2023). La Tabla 1 muestra la superficie sembrada de las cinco principales hortalizas cosechadas en México.

Tabla 1. Principales hortalizas producidas en México (SIAP, 2022b).

Nombre de la hortaliza	Hectáreas cosechadas
Chile poblano (<i>C. annuum</i> var. Poblano)	148,000
Elote (<i>Zea mays</i>)	69,000
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	48,000
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	48,000
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	18,000

Para el cierre agrícola para el año 2021 el SIAP reportó la siembra de tomate (*S. lycopersicum*) aproximadamente en 6,176 ha a nivel nacional en sus distintas variedades: bola, cherry, uva, saladette y saladette roma, ambos datos exclusivamente para exportación (SIAP, 2022a).

El tomate (*S. lycopersicum*) es importante en la alimentación, se le atribuye la aportación de vitaminas C y A, además de minerales como el potasio. Una de las principales enfermedades que afectan a esta hortaliza, dentro de sus primeras etapas de desarrollo en invernadero o campo, es el marchitamiento del tallo o mejor conocido como “damping- off” (SAGARPA, 2022; Bojacá-Aldana y col., 2023).

Actualmente en México el 90% del suelo utilizado para la agricultura son suelos en estado crítico debido al uso de fertilizantes, pesticidas, fungicidas sintéticos, contribuyendo a la crisis climática que ha provocado su desertificación y degradación, en la búsqueda de nuevas tecnologías más sostenibles, las alternativas de productos agroquímicos microbiológicos resultan de interés actual (Gavito y col., 2017).

2.2 Plagas y enfermedades asociadas a hortalizas

Los cultivos de hortalizas son afectados por distintos tipos de insectos, malezas, hongos, bacterias y virus. El adecuado manejo integrado de plagas de los cultivos marca una diferencia en cuanto a los rendimientos obtenidos (Cedillo-Portugal y col., 2023). Las malezas compiten por nutrientes y agua con las hortalizas y son hospederos importantes para el desarrollo de parasitoides o depredadores que dañan a las hortalizas. Lo anterior se traduce en afectaciones a nivel productivo y económico (Correa y col., 2023).

Los virus se transmiten de manera vegetativa y mecánica; en esta última, se incluyen los insectos que son usados como vectores. Por ejemplo, el género tobamovirus de la familia *Virga viridae* afecta distintas hortalizas como el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la calabaza (*Cucurbita pepo*); en específico, el ToBRFV conocido comúnmente como virus del mosaico del tabaco, daña el fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*) en su color no uniforme (Figura 2 a), rendimiento y madurez atrasada (Cedillo- Portugal y col., 2023).

Por otro lado, bacterias fitopatógenas como *Pectobacterium carotovorum*, conocida por provocar la enfermedad de la podredumbre blanda, afecta principalmente a la papa, generando pérdidas económicas estimadas entre los 50 y 100 millones de dólares por año a nivel mundial (Al-Zomor y col., 2013), también afecta a cultivos como cebolla (*Allium cepa*) (Figura 2-b), espárrago (*Asparagus officinalis*), acelga (*Beta vulgaris* var. Cicla), papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Rossini y col., 2023).

Las plagas por insectos reducen la producción agrícola y la calidad de cultivos. Algunos ejemplos son: el pulgón de la lechuga (*Nasonovia ribisnigri*) (Figura 2-c) y *Henosepilachna vigintioctopunctata* en la berenjena (*Solanum melongena*) (Figura 2-d) (Liu y col., 2021; Vera-Sánchez y col., 2022).

Los hongos fitopatógenos causan enfermedades en las raíces, el tallo, las hojas, y en los frutos (Cedillo-Portugal y col., 2023). De manera específica, el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* produce en el tomate (*Solanum lycopersicum*) la enfermedad comúnmente conocida como “tizón tardío” (Figura 2-e) (Vera-Sánchez y col., 2022).

Existen hongos fitopatógenos que afectan a una amplia gama de hospederos como lo es *Phytophthora capsici*, el cual, incide sobre cultivos de la familia de las solanáceas y provoca daños en cultivos como el pimiento (*C. annuum*) (Figura 2-f), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*), entre otros (Caamal-Velázquez y col., 2018). Otro de ellos es *Macrophomina phaseolina*, agente causal de la enfermedad conocida como “podredumbre carbonosa”, causa pérdidas importantes en la producción de soya (*Glycine max*) (Martínez-Villarreal y col., 2016).

Las cenicillas (también conocida como mildius polvorientos), son causadas por distintos géneros de hongos; entre estos encuentran los *Erysiphales* de la familia *Erysiphaceae*, producen ascocarpos y en grandes cantidades, forman un polvillo blanco, lo cual permite reconocer a esta enfermedad en forma de polvo o ceniza que afecta a hortalizas como la calabaza (*Cucurbita pepo*) y pepino (*Cucumis sativus*) (Figura 2-g) por mencionar algunos (Félix-Gastélum y col., 2017).

El óidio causado por *Erysiphe cichoracearum* y *E. communis*, son hospedantes del pimiento (*C. annuum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) (Figura 2-h) y la berenjena (*Solanum melongena*), infecta las hojas de la planta, volviéndolas blancas hasta provocar su muerte (Rossini y col., 2023). En la podredumbre blanca provocada por *Sclerotinia sp.* y *Sclerotium sp.*, los hospederos principales son la lechuga (*Lactuca sativa*) y la acelga (*Beta vulgaris* var. cicla); esta enfermedad provoca un colapso de hojas basales por podredumbre y persiste en lugares previamente infectados como el suelo o residuos de cultivo (Cedillo-Portugal y col., 2023).

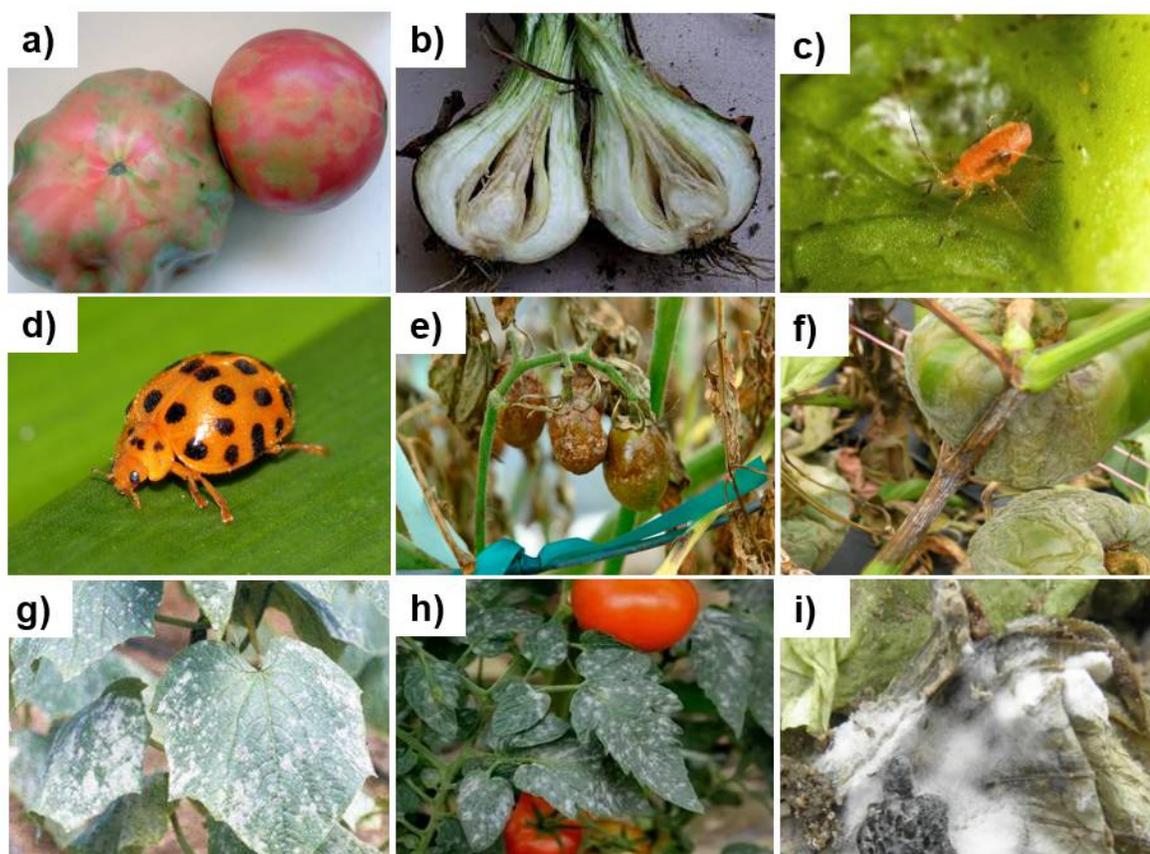


Figura 2. Ejemplos de enfermedades en hortalizas por hongos, virus e insectos. (a) Virus ToBRFV en cultivo de tomate (*S. lycopersicum*). (b) *Pectobacterium carotovorum* presente en cebolla (*Allium cepa*). (c) *Nasonovia ribisnigri* en lechuga (*Lactuca sativa*). (d) *Henosepilachna vigintioctopunctata*. (e) *Phytophthora infestans*.

en tomate (*Solanum lycopersicum*). (f) *Phytophthora capsici* en cultivo de pimiento (*C. annuum*). (g) Mildiu polvoriento en hojas de pepino (*Cucumis sativus*). (h) Oídio en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). (i) *Sclerotinia* sp. en lechuga (*Lactuca sativa*). Imágenes obtenidas de: (González-Morejón y col., 2010, Orozco, 2022; Aguado-Martínez y col., 2023; BASF, 2023; Delhey y col., 2023; Syngenta, 2023; Otero, 2023).

2.3 “Damping- off” o Marchitamiento del Tallo

El término “damping- off” hace referencia al marchitamiento, desintegración o ahogamiento de los tejidos del tallo y la raíz debajo del suelo, nombrado de manera común como “ahorcamiento de tallo”, “mal de almaciguera” o “mal del talluelo”. La mayoría de los hongos fitopatógenos que causan esta sintomatología afectan el crecimiento de la planta en las primeras etapas hasta su madurez (Laemmlen, 2002).

Es una enfermedad que se trasmite por el suelo (Marzani y col., 2017), conduce a la pudrición de semillas en germinación y plántulas jóvenes (Lamichhane y col., 2017). A simple vista pareciera que las plantas padecen de estrés hídrico, debido al ahorcamiento del tallo. De acuerdo con la Secretaría de Ganadería, Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), causa pérdidas de entre el 30% al 50% de plántulas (SAGARPA, 2022).

Los principales agentes causales del “damping- off” son: *Fusarium solani*, *Stymphylium* sp., *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Alternaria alternata*, *Helminthosporium* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Marzani y col., 2017; Wiyono y col., 2021; Azzam y col., 2022), los últimos tres son de los principales hongos señalados en la literatura (Marzani y col., 2017; Martinuz, 2020; Yu y col., 2023). De manera general, estos hongos fitopatógenos consiguen sobrevivir durante muchos años en el suelo, aun

sin algún cultivo presente debido a la formación de esporas y esclerocios (SAGARPA, 2022).

El establecimiento del “damping- off” se puede presentar en dos fases del ciclo de la vida de las plantas. La primera se da previo al brote. La semilla es infectada por el consorcio de hongos, provocando su pudrición o no logra germinar. La segunda fase es posterior al brote. Se observan lesiones acuosas formadas en los tejidos antes de emerger del suelo (Figura 3-a), y al emerger, presentan lesiones en el tallo a nivel del suelo (Figura 3-b), atrofiamiento (Figura 3-c o Figura 3-d) y las áreas afectadas presentan crecimiento desigual (Lamichhane y col., 2017). Lo anterior se agudiza por distintos factores como el potencial osmótico y la concentración de etileno. Además, de factores abióticos como humedad y textura de suelo, entre otros (SAGARPA, 2022).

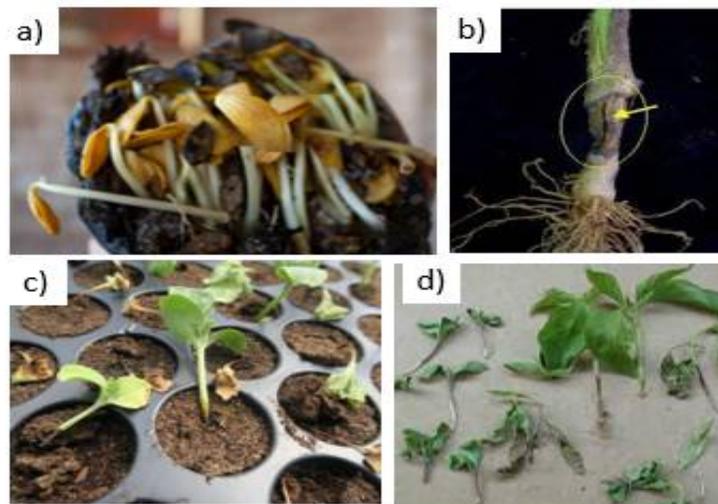


Figura 3. Sintomatología de “damping- off”. (a) ablandamiento y pudrición de semillas de calabaza (*Cucurbita moschata Duchesne*). (b) Lesión en tallo en plántula de tomate (*Solanum lycopersicum*). (c) Almacigo de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) con marchitamiento por “damping- off”. (d) Crecimiento desigual en plántulas de chile (*C. annuum*) por “damping- off”. Imágenes obtenidas de (Chaplygina, 2023; Fertilab, 2023; Johnson y Nischwitz, 2023; Malvick, 2023).

2.3.1 *Fusarium* sp.

El género *Fusarium*, es común y diverso en suelo; incluye un número importante de especies de fitopatógenos que tienen distribución mundial (Leyva-Mir y col., 2017). Son ascomicetos filamentosos cuyas afecciones en los distintos cultivos generan daños irreversibles en las plantas infectadas; existen distintas especies de este género de fitopatógeno. En el microscopio es posible apreciar las macroconidias alargadas, características de este hongo (Figura 5-b). Sobrevive en forma de esporas, micelio o clamidosporas (Lamichhane y col., 2017; Martinuz, 2020).

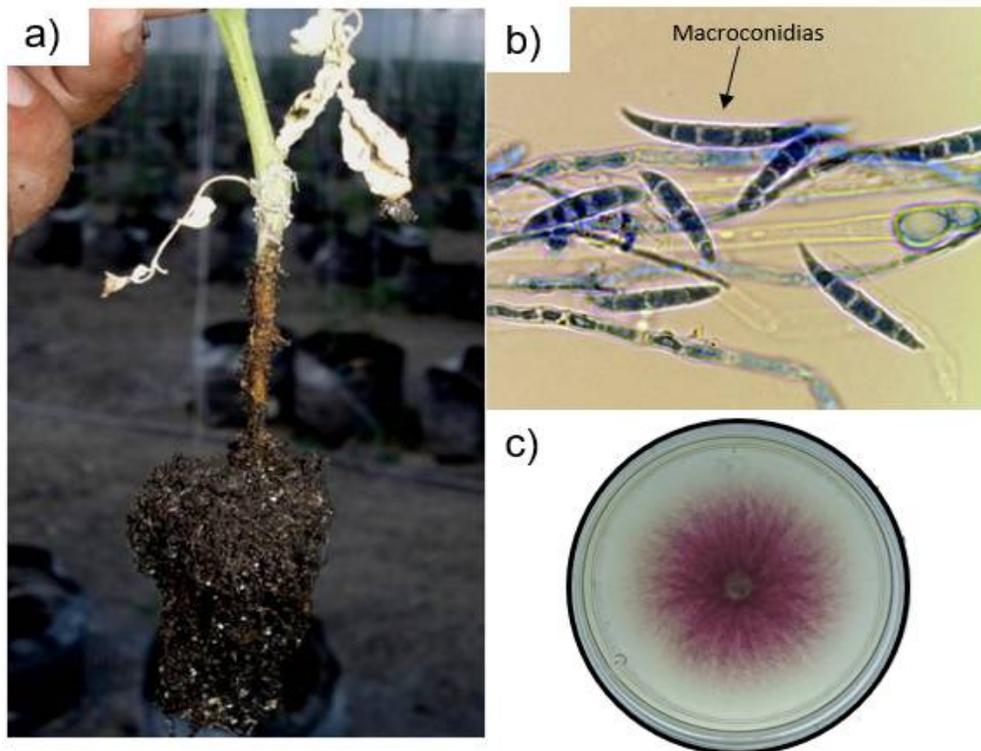


Figura 4. *Fusarium oxysporum*. (a) Plántula de tomate (*Solanum lycopersicum*) con daño en el tallo por *Fusarium oxysporum*. (b) Macroconidias de *Fusarium*

oxysporum. (c) *Fusarium oxysporum* en la caja Petri sembrada en agar APD. Imágenes obtenidas de (Durán-Barradas y col., 2023; Leslie y Summerell, 2023).

Fusarium oxysporum afecta distintos tipos de hortalizas como el chile poblano (*C. annuum*) (Azeem y col., 2022), tomate (*S. lycopersicum*) y pepino (*Cucumis sativus*) (Lucena y col., 2022). En la siguiente tabla se muestra su clasificación taxonómica según EPPO (2023).

Tabla 2. Clasificación taxonómica *Fusarium oxysporum*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Genero	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>F. oxysporum</i>

El ciclo de vida inicia en el suelo; posteriormente, la infección ocurre en las etapas tempranas del cultivo. Las clamidosporas o conidios germinan y penetran plantas susceptibles, ingresan al xilema, y comienzan a tapan el tejido para reducir el movimiento del agua (Sánchez-Espinosa y col., 2020), hasta que se presenta daño en el tallo (Figura 5-a). Este fitopatógeno también produce color amarillento en las hojas de la planta infectada (Leyva-Mir y col., 2017).

2.3.2 *Rhizoctonia solani*

Las enfermedades causadas por este hongo son monocíclicas y no producen inoculo secundario. Es transmitido por el suelo donde habita y se presenta en cualquier etapa del crecimiento del cultivo (Pereira-Goulart, 2022). Este hongo es productor de esclerocios marrones de forma irregular y de basidiósporas; la infección está en función de la humedad y temperatura, misma que provoca la muerte de semillas o plántulas (Chávez y Aquino-Jara, 2012; Ponce-Martins y col., 2022).

A nivel de microscopio presenta ramificaciones de micelio que crecen en ángulos rectos en relación con la hifa principal (Figura 6-b); se aprecia la formación de un septo de la ramificación cercano al punto de origen (Montero-Tavera y col., 2013). Este hongo se ha reportado en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) (Figura 6-a) (Akram y col., 2015), pimiento morrón (*C. annuum*) (Azeem y col., 2022), soja (*Glycine max*) (Pereira-Goulart, 2022) y cilantro (*Coriandrum sativum*) (Ponce-Martins y col., 2022). Ha sido estudiada su infección en distintas variedades de chile (*C. annuum*) como el mirasol, serrano, güero, poblano, caribe y jalapeño, que induce a su ahorcamiento (Montero-Tavera y col., 2013; Bhattarai y col., 2020). En la Tabla 4. se muestra su clasificación taxonómica según EPPO (2023).

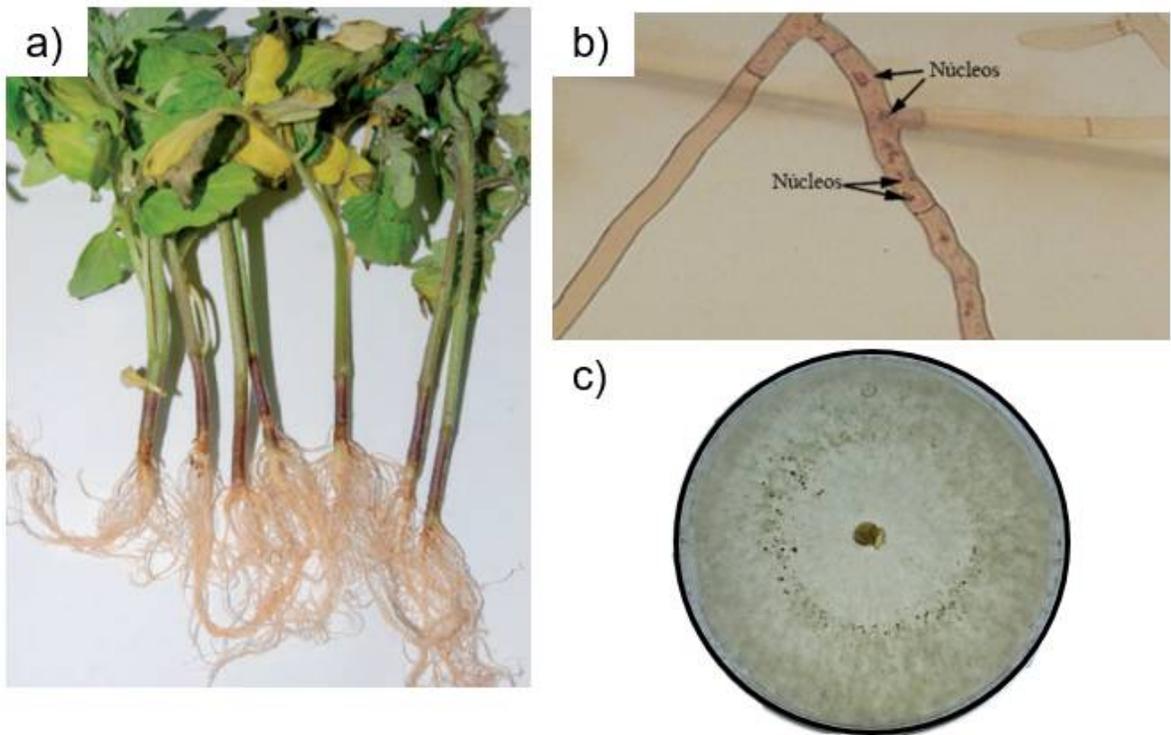


Figura 5. *Rhizoctonia solani*. (a) Imagen de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*). (b) Hifa del fitopatógeno teñido con safranina, se señalan algunos núcleos. (c) *Rhizoctonia solani* en la caja Petri sembrada en agar APD. Modificado de (Akram y col., 2015; Montero-Tavera y col., 2013).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Rhizoctonia solani*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Agaricomycotina
Subclase	Agaricomycetes
Orden	Ceratobasidiales
Familia	Ceratobasidiaceae
Genero	<i>Rhizoctonia</i>
Especie	<i>R. solani</i>

2.3.3 *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici puede causar diferentes síntomas al infectar a su hospedero; la pudrición se da en todas las etapas de las plantas, iniciando en las semillas. El tizón foliar produce pudrición y marchitamiento en las plántulas (principalmente en la raíz y cuello de estas) (Quispe-Quispe y col., 2022). *P. capsici* se ha descrito como un hongo fitopatógeno con esporangios ovoides con dimensiones muy variables, sus oosporas son de color marrón y es una especie que carece de clamidosporas (Godwin y col., 1995; Martínez- Ruiz y col., 2016).

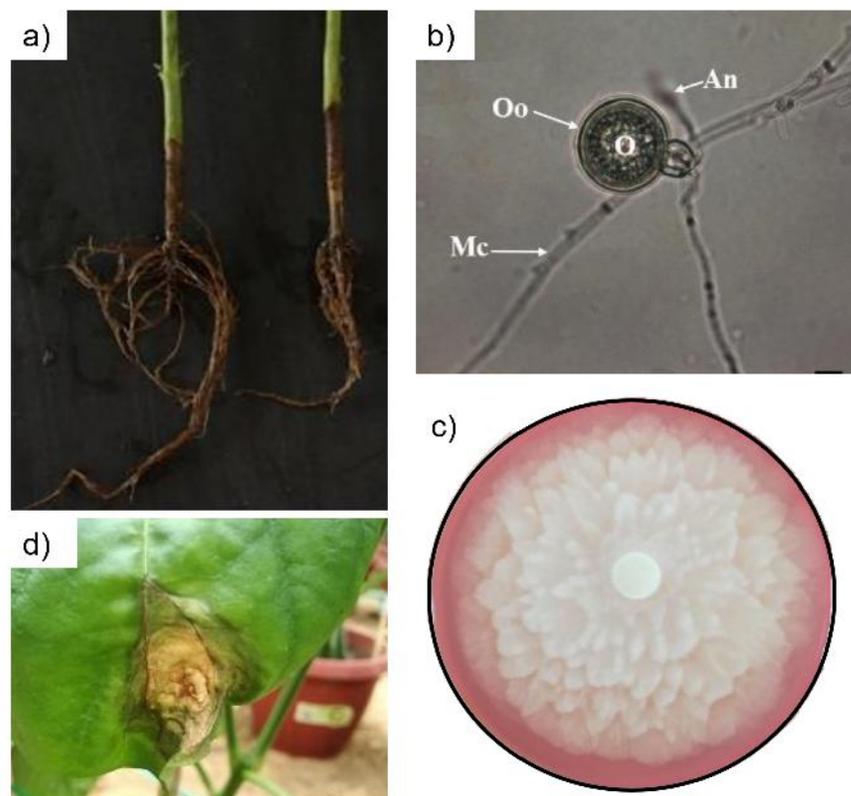


Figura 6. *Phytophthora capsici*. (a) síntomas producidos en tallo y raíz de plántulas de *C. annuum* (b) Micelio cenocítico (Mc), oogonio (Oo; gametangio femenino) y oospora (O; espora sexual) anteridio (An; gametangio masculino), (c) crecimiento de micelio en la caja Petri (d) pudrición producida en hojas de *C. annuum* causada por el fitopatógeno. Imágenes obtenidas de (Quispe-Quispe y col. 2022).

Este patógeno polífago es capaz de infectar a cultivos de pimiento dulce (*C. annuum*), otro tipo de hortalizas como el jitomate (*S. lycopersicum*), la calabaza (*Cucurbita* spp.), la berenjena (*S. melongena*) (Syed-Ab-Rahman y col., 2019; Saltos y col., 2022). Tiene una alta dispersión. Se da debido a su rápido crecimiento y adaptabilidad. En la Tabla 4 se muestra su clasificación taxonómica según Dick y colaboradores en 1984.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Phytophthora capsici*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Pseudofungi
Clase	Oomycetes
Subclase	Peronosporomycetidae
Orden	Peronosporales
Familia	Peronosporaceae
Genero	<i>Phytophthora</i>
Especie	<i>P. capsici</i>

2.3.4 Productos de síntesis química para el control del “damping- off”.

Para el “marchitamiento del tallo”, se pueden aplicar distintos productos químicos. De manera directa, en la semilla se utiliza: el etridiazol ($C_5H_5Cl_3N_2OS$), el metalaxil ($C_{15}H_{21}NO_4$), el benomilo ($C_{14}H_{18}N_4O_3$) y el tiofanato de metilo ($C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$), aunque es posible que genere un efecto negativo en la germinación, con efectividad de entre el 80% y 90 % (Lamichhane y col., 2017). Existen fungicidas específicos de igual aplicación como: Pencycuron ($C_{19}H_{21}ClN_2O$) que tiene efectividad para *Rhizoctonia solani* (Pereira-Goulart, 2022).

De forma indirecta en semillas se usan: Ridomil G (composición de etilen bisditió carbamato de manganeso, metil N-(2,6-dimetil fenil)-N-(2- metoxi-acetil)-D-alaninato y zinc), Topsin (ingrediente activo tiofanato de metilo) y Fontelis (mezcla de pirazol carboxamidas), sin embargo, se ha demostrado que Ridomil G y Topsin no son capaces de eliminar hongos como: *Helminthosporium* sp., *Rhizoctonia*

solani, *Alternaria alternata*, *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. y *Stymphylium* sp. (Marzani y col., 2017).

Para el año 2019, el SIAP reportó que, en México, se aplicaron productos de síntesis química a 20,664,554 ha, de los cuales el 43% corresponde al uso de productos de sanidad vegetal, algunos catalogados como tóxicos en distintas normativas internacionales que provocan afectaciones a la salud (Juárez, 2022; SIAP, 2022a).

El uso excesivo de productos de síntesis química para la sanidad vegetal aunado a las malas prácticas en la agricultura como el monocultivo favorecen la pérdida de biodiversidad del suelo, la desertificación y el calentamiento global (FAO, 2023b); además del reemplazo de procesos ecológicos naturales (Gavito y col., 2017; Aguilar y col., 2019; Zhao y col., 2021). Según datos de la FAO a nivel mundial, en el año 2019 se utilizaron un total de 41,681 t de pesticidas, que equivale a 1,310,000 t de CO₂ (FAO, 2023d).

2.3.5 Productos sustentables para el control del “damping- off”

El uso de productos sustentables beneficia al ambiente al ser menos tóxicos y generar pocos residuos en comparación con los productos de síntesis química, además de favorecer a la economía de los productores (Alves-Ribeiro y col., 2021). Los extractos vegetales forman parte de este género, ya que son insumos orgánicos provenientes de plantas. Estos han sido utilizados para el tratamiento del “damping-off” (Lamichhane y col., 2017).

Un ejemplo de ello es un estudio realizado por Centurión-Belotto y col. (2013), quienes evaluaron distintos tipos de extractos y combinaciones de menta (*Mentha piperita*), yvope (*Gleditsia amorphoides*), ajo (*Allium sativum*) y ramio (*Boehmeria nivea*) contra *Rhizoctonia solani* en plántula de tomate (*Solanum lycopersicum*). Parte de sus resultados muestran que el uso de la mezcla de menta (*Mentha piperita*) y ajo (*Allium sativum*) redujo la incidencia de la sintomatología del damping-

off provocada por *R. solani*, además del mayor promedio en la altura y el crecimiento radicular de las plántulas.

Los microorganismos con actividad antifúngica han sido utilizados para el control biológico del damping-off, siendo otra opción a los productos de síntesis química (García-De Salamone, 2022). Estos interactúan con los fitopatógenos a través de distintos mecanismos de acción, desarrollados a continuación (Lamichhane y col., 2017).

(a) Antibiosis: es la producción de antibióticos tóxicos para los organismos patógenos. Un microorganismo que realiza este tipo de mecanismo es el hongo *Trichoderma*, que produce antibióticos como alquilpironas, isonitrilos, poliquétidos, peptaiboles y algunos esteroides (Martínez y colaboradores, 2013).

(b) Parasitismo: se le conoce así a la acción biológica que se da entre dos especies diferentes, en donde el parásito vive a expensas del hospedero. Se ha demostrado que *Trichoderma*, puede desarrollar este mecanismo con distintos hongos fitopatógenos. Entre sus múltiples interacciones con el huésped puede llegar a producir enzimas líticas extracelulares que terminan por degradar las membranas celulares del patógeno (Coromoto-Alcedo y Reyes, 2018).

(c) Competencia por nutrientes: Se entiende como la demanda sincrónica de los mismos recursos por más de dos poblaciones microbianas. Aunque la mayoría de los microorganismos practican este mecanismo de acción, *Candida oleophila* ha sido utilizada como agente de biocontrol de *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*, obteniendo reducciones en la germinación de conidios casi del 100 % en ambos casos, estos resultados han sido atribuidos a su disputa de proteínas y azúcares (Guerrero-Prieto y col., 2023).

(d) Producción de metabolitos secundarios: Existe una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden ser antagónicos con diferentes tipos de hongos fitopatógenos. Un ejemplo de estos son los lipopéptidos, de manera específica fengicina y surfactina que son producidos por diferentes especies de *Bacillus* entre ellos *Bacillus amyloliquefacien*. Ambos provocan inhibiciones de casi

el 100 % en la germinación de conidios en especies como *P. capsici* (Ley-López y col., 2022).

Trichoderma es uno de los hongos que se ha estudiado ampliamente por su actividad antagónica. La especie *T. harzianum* ha mostrado inhibición de esporas de *Fusarium oxysporum* en un 33% y *Trichoderma atroviridae* en un 57% (Martinez y col, 2013). Por su parte, Coromoto-Alcedo y Reyes (2018) apuntan que el uso de *Trichoderma koningii* presenta una respuesta de biocontrol hacia *A. alternata* a nivel semilla en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) con una reducción en el porcentaje de germinación de conidios de casi el 90 %.

En el uso de microorganismos se pueden utilizar bacterias en el control biológico, se han estudiado como una opción, debido a que desempeñan un papel en el crecimiento, tolerancia y prevención de enfermedades de los cultivos (Rilling y col., 2019; Khanna y col., 2021). *Bacillus* spp es uno de los géneros ampliamente aplicados en el antagonismo fúngico (Azeem y col., 2022). Sus cepas son consideradas no patógenas para el humano y no impactan negativamente en las comunidades microbianas ya existentes de los agroecosistemas (Villarreal-Delgado y col., 2018).

2.4 Perspectiva del género *Bacillus*

En la literatura se han reportado especies del género *Bacillus* como *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. clausii* con una actividad antagónica para *Botrytis cinérea* con más del 60% de inhibición (Márquez y col., 2020). *B. safensis* y *B. pumilus* presentan un potencial antifúngico contra *Sclerotinia sclerotiorum*, participante en el “marchitamiento del tallo” (Alves-Ribeiro y col., 2021). Finalmente, *B. amyloliquefaciens* ha mostrado antagonismo hacia el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Cabe resaltar que este género de bacteria es importante por su resistencia conferida a través de la formación de esporas, lo que facilita su aplicación y permanencia en campo (Pedraza y col., 2020).

Para la búsqueda de bacterias que presenten actividad inhibitoria han sido investigados distintos sitios de estudio, así como partes de la planta, hojas, tallo y endófitos de las mismas debido a su asociación simbiótica, y se indaga en el uso del suelo rizosférico debido a la relación que pudieran tener las bacterias rizosféricas con la colonización de la raíz, junto con la producción de metabolitos secundarios benéficos para la planta hospedera y el antagonismo con distintos tipos de hongos (Alves-Ribeiro y col., 2021).

2.4.1 ¿Dónde encontrar a *Bacillus*?

La búsqueda de *Bacillus* se puede realizar en diferentes nichos ecológicos. El aislamiento de este género ha sido realizado en plantas que crecen en ecosistemas adversos; un ejemplo de ello es *Plectranthus tenuiflorus*, planta encontrada comúnmente en zonas montañosas de Arabia Saudita, de la cual fueron aisladas bacterias endófitas de raíz, tallo y hojas. En cada sección se identificó al menos una bacteria *Bacillus* sp. (El-Deeb y col., 2012).

De igual forma, se ha indagado en los mismos cultivos de interés a los que se desea mejorar su nutrición o proteger contra distintos fitopatógenos. Un ejemplo de esto son los aislados obtenidos del maíz (*Zea mays*) donde se obtuvieron dos cepas con capacidad antifúngica para *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*, además de ser caracterizadas como promotoras de crecimiento vegetal e identificadas como *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (Azeem y col., 2022).

De tal manera que el aislamiento de bacterias se considera un recurso potencial para su uso como biocontrol en el sector agrícola, en China se obtuvieron un total de 244 aislados bacterianos pertenecientes a la zona endófitas de la raíz de *Polygonum cuspidatum* (planta medicinal China), en donde el género *Bacillus* fue predominante con especies como *Bacillus cereus*, *B. thuringensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. arybhatai*, estas han sido reportadas con anterioridad como antagonistas contra distintos fitopatógenos (Sun y col., 2013).

Al igual que el caso anterior, se han realizado el aislamiento en tallo y hojas de bacterias en *Tinospora cardifolia* es una planta con inmensas propiedades medicinales utilizada de manera común en India, de los cuales se identificó a *Bacillus Albus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus toynensis*, *Bacillus velencensis*, *Bacillus paranthracis*, sumando un total de 31 aislados pertenecientes a este género de 38 especies analizadas (Duhan y col., 2020).

Otro ejemplo es el aislamiento de bacterias de hojas y tallo de *Paspalum vaginatum*, de los 24 aislados obtenidos, siete presentaron actividad antagónica contra *A. alternata* y fueron identificados como *Bacillus* sp. (Vasconcelos-Fernandes y col., 2023)

Esta especie ha demostrado que no solo presenta propiedades antagónicas contra otro tipo de microorganismos, sino también la producción de distintos metabolitos que favorecen al desarrollo de la planta, por lo que muchas especies de este género son consideradas bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Sun y col., 2013).

En este sentido, en México la orquídea *G. skinneri* se encuentra registrada en la NOM-059-SEMARNAT-2010, al explorar su diversidad microbiana rizosférica, fueron identificados al menos dos aislados pertenecientes al género de *Bacillus* sp., adicionalmente se realizaron evaluaciones de promoción de crecimiento donde el mismo género presenta mejores resultados que el resto de las cepas (Aguilar- Diaz, 2018).

De manera general, las plantas pueden crecer en distintos tipos de ambientes con usos y factores abióticos diferentes como la especie, el lugar donde está establecida, incluso de la zona de aislamiento; sin embargo el género *Bacillus* es predominante considerándolo un organismo cosmopolita con múltiples beneficios desde antagónicos así como la producción de metabolitos secundarios que favorezcan al crecimiento de la planta, por lo que la exploración de poblaciones microbianas es importante porque podrían ser encontrados microorganismos novedosos que puedan ser utilizados con un fin específico (El-Deeb y col., 2012).

2.5 Plantas invasoras

Las plantas invasoras compiten con plantas nativas o incluso con cultivos de interés hasta desplazarlos, pues presentan atributos característicos que las vuelven superiores a especies originarias (Richardson y Kluge, 2008). Según lo descrito por Llewellyn y colaboradores (2011), los rasgos mostrados a continuación definen la abundancia de este tipo de plantas en lugar diferente al de origen, de los que destacan:

1. El modo de dispersión.
2. Su mecanismo de defensa.
3. Competitividad.
4. La necesidad y monopolización los recursos.
5. Sus bancos de semillas.
6. El tamaño de su semilla.
7. La tasa de crecimiento.

Cabe mencionar que no solo depende de los atributos de estas especies para invadir un espacio determinado, sino que también influirá el contexto del sistema ecológico, como las especies nativas o si existen especies que puedan competir con la planta invasora en el lugar (Lockwood y col., 2009). Además de considerar la susceptibilidad del hábitat a colonizar en los que influye su clima, su viabilidad de recursos aprovechables, el viento, entre otros aspectos abióticos (Wan y col., 2017).

Las plantas invasoras pueden abrirse camino adaptándose y los factores limitantes como la humedad, la temperatura o la disponibilidad de nutrientes no las afecta; son de importancia, ya que llegan a ocasionar cambios en las cadenas tróficas, hasta la pérdida de biodiversidad (Wilson y col., 2009). A pesar de los efectos adversos, debido a que este tipo de plantas compiten por espacio, es posible que el reclutamiento de sus poblaciones microbianas asociadas le confiera ventajas de supervivencia (Chen y col., 2017; Daouti y col., 2022).}

2.6 *Kalanchoe delagoensis*.

Es una planta invasora, perenne, tóxica, nativa del continente africano y alcanza una altura hasta de dos metros y medio. *Kalanchoe delagoensis* crece en densos grupos; tallos simples, erectos, cilíndricos; hojas ternadas a aparentemente opuestas o alternas; su color rojizo-verde a gris-verde, con manchas rojizas o marrones; su ápice contiene dientes con numerosos bulbos; sus flores péndulas, en forma de cáliz campanulado rojizo a verde estriado con rojo, corola roja, violeta, naranja claro o amarillo manchado con rojo (Figura 7) (Descoings,2003; CABI, 2022).

Su presencia en México se ha reportado en los estados de Veracruz, Hidalgo, San Luis Potosí, Yucatán y Querétaro (Golubov-Figueroa, 2023). Su rango de dispersión es alto, puede propagarse por el viento debido a sus diminutas semillas y consigue colonizar distintos tipos de ambientes en el país. Se ha demostrado su gran adaptabilidad a diferentes condiciones abióticas y distintos rangos edafológicos (MERI, 2022).



Figura 7. *Kalanchoe delagoensis*. Imagen obtenida de (Gajardo, 2023).

El subgénero *Bryophyllum* (género *Kalanchoe*, *Crassulaceae*) contiene más de 25 especies, ampliamente utilizadas con fines ornamentales y medicinales (Descoings, 2006). El género *Kalanchoe* se ha usado en la medicina tradicional para el tratamiento de varias dolencias, incluidas infecciones, diabetes, reumatismo, enfermedades inflamatorias y neoplásicas en América del Sur (Quazi- Majaz y Molvi, 2011). La especie *Kalanchoe integra* ha sido estudiada para estos mismos fines (Asiedu- Gyekye y col., 2013), al igual que *Kalanchoe spanthulata* (Sharma y Jha, 2011).

Abdul-Saleem y colaboradores (2022) evaluaron el extracto etanólico de *Kalanchoe delagoensis* por su actividad antimicrobiana para *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y Neumonía por *Klebsiella*, probada por el método de dilución en agar, de donde se obtuvieron zonas de inhibición que van desde 26 mm hasta casi 39 mm. *K. delagoensis* mostró resultados positivos y fue clasificada, según los autores con actividad antimicrobiana de leve a moderada.

Debido a la clasificación de esta especie como planta invasora y al precedente de las distintas especies de plantas en donde se puede encontrar el género *Bacillus*, es probable que en *Kalanchoe delagoensis* existan, dentro de sus poblaciones microbianas asociadas a su raíz, bacterias que le faciliten la supervivencia, obtención de nutrientes para su desarrollo y para el control de plagas, por lo que su exploración es de interés para este proyecto (Daouti y col., 2022). A continuación, la clasificación taxonómica *Kalanchoe delagoensis* según EPPO (2023).

Tabla 5. Clasificación taxonómica *Kalanchoe delagoensis*.

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Bryophyllum
Subclase	Basal core eudicots
Orden	Saxifragales
Familia	Crassulaceae
Genero	<i>Kalanchoe</i>
Especie	<i>K. delagoensis</i>

2.7 Actividad de promoción de crecimiento vegetal en cepas bacterianas

Las denominadas Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés), favorecen la producción de especies de interés hortícola y benefician la fertilidad del suelo debido a sus relaciones con las raíces de las plantas hospederas (Figura 7) (Martínez-Ramón y col., 2013; Akram y col., 2015). Interactúan de forma colaborativa y mejoran el acceso a los nutrientes del suelo. Pueden ser obtenidas de la rizósfera, partes endófitas o epífitas de la planta (Quiza y col., 2015; Patel y col., 2022).

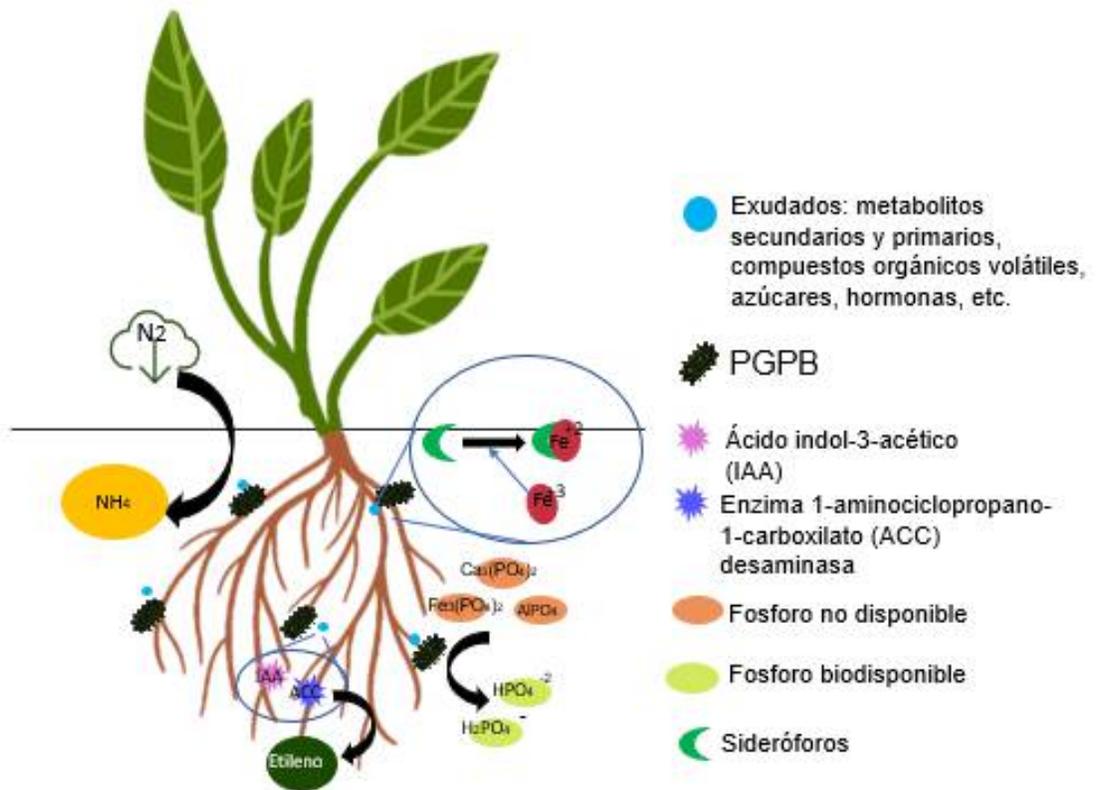


Figura 8. Algunas interacciones benéficas planta- PGPB. Elaboración propia, con información recuperada de (Gamalero y col., 2003; Vessey, 2003; Olanrewaju y Babalola, 2017; Rolfe y col., 2019; Khanna y col., 2021; García de Salamone, 2022; Olanrewaju y Babalola, 2022; Patel y col., 2022).

Estas interacciones se dan en la raíz de la planta colonizada por las PGPB. Su coexistencia en la rizósfera está controlada por señales denominados exudados, emitidas por las plantas a través de las raíces. Los exudados actúan como catalizadores o activadores de las interacciones entre las plantas y el suelo; sirven, principalmente, para reclutar microorganismos en la rizósfera (Olanrewaju y Babalola, 2022). Estos exudados son metabolitos secundarios, compuestos orgánicos volátiles, azúcares, hormonas y metabolitos primarios, entre otros (Rolfe y col., 2019).

Las PGPB están involucradas con la producción de fitohormonas en las plantas, mismas que funcionan como mensajeros químicos que desempeñan acciones sobre su fisiología y desarrollo; estas hormonas incluyen auxina, giberelinas, etileno, citoquininas y ácido abscísico (Khanna y col., 2021). Un ejemplo de fitohormona es el ácido indolacético (IAA), que es la forma de auxina mejor caracterizada, producida por bacterias y plantas; promueve la germinación de semillas, la división, la elongación celular y el desarrollo de raíces (Olanrewaju y Babalola, 2022).

Otro ejemplo de estas hormonas es el etileno, el cual está asociado al estrés de la planta, mismo que se da por distintos factores como salinidad, falta de agua, entre otros. Es importante porque estimula la germinación, el crecimiento de brotes y promueve la madurez de los frutos. Esta maduración provoca que tengan menos tiempo de anaquel. En ese sentido, se vuelve más crítica su regulación en las últimas etapas de crecimiento de la planta debido a que puede generar pérdidas económicas (Mishra y col., 2021).

Otra de las actividades de las PGPB es la producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa que regula la producción del etileno, además ha sido asociada al crecimiento de las plantas y el control de patógenos (Gamalero y col., 2003; Alves y col., 2022; García-De Salamone, 2022; Olanrewaju y Babalola, 2022).

La solubilización de fosfato es importante en la relación entre las PGPB y la planta debido a que el fosfato es uno de los macronutrientes esenciales para su desarrollo y crecimiento de las plantas, la floración, la fotosíntesis, entre otros (Vessey, 2003). El fosfato presente en el suelo es transformado por las bacterias gracias a que estas, a través de la liberación de ácidos orgánicos, acidifican el suelo, de tal manera que facilitan la absorción de este elemento al transformarlo en fosfato di o monobásico, ya asimilable para las plantas (Patel y col., 2022).

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que también es realizado por PGPB (diazótrofos) de manera individual o en simbiosis con especies vegetales que transforman el nitrógeno atmosférico a amoníaco (NH_3) y este es rápidamente ionizado a amonio (NH_4^+). Continuando con su transformación a compuestos asimilables para el aprovechamiento de las plantas como el nitrato (NO_3). El nitrógeno biodisponible es usado por las plantas principalmente para la producción de aminoácidos y de manera consecuente proteínas, y también en el proceso de fotosíntesis (Vessey, 2003).

La producción de sideróforos se estudia dentro de las interacciones que pueden tener este tipo de microorganismos (PGPB) con la planta. Estos han sido estudiados debido a la obtención del hierro presente en el suelo en beneficio de las plantas, o bien activar la resistencia sistémica de esta. En el suelo, el hierro puede existir en la forma ferrosa (Fe^{2+}) que será oxidada a la forma férrica (Fe^{3+}), en forma de silicatos de hidróxidos, óxidos de hierro u ferromagnesio que no son asimilables para la planta. La afinidad tan elevada de los sideróforos por el hierro facilita su captación y forma un complejo con su forma férrica. Mediante un receptor específico que se encuentra en la membrana bacteriana, que permite que este metal no sea aprovechado por otros microorganismos, la planta absorbe el complejo y el hierro en forma Fe^{+3} para ser reducido dentro de ella y absorbido fácilmente (Aguado-Santacruz y col., 2012; Olanrewaju y Babalola, 2017).

Otra interacción estudiada en la que participan las PGBP y las plantas es la producción y uso de lipopéptidos. Estos son compuestos de bajo peso molecular con características anfífilas (Hashem y col., 2023), que brindan defensa a las

plantas en condiciones posteriores y previas a la cosecha al suprimir a los hongos patógenos o al inducir resistencia sistémica en las plantas hospederas (Pedraza y col., 2020; Hashem y col., 2023)

El desafío para el uso de este tipo de bacterias *in vivo* va a depender de distintos factores bióticos como la planta huésped y en qué fase del desarrollo es inoculada y factores abióticos como el clima, tipo de suelo y su salinidad, entre otros. En el caso particular del género *Bacillus*, tiene la ventaja sobre estos últimos debido a su formación de endóspora, lo que lo vuelve más resistente; actualmente ya existen en el mercado productos en donde su componente principal son bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, entre otros (Lou y col., 2017; Yang y col., 2017).

De la información mencionada se deriva la necesidad de evaluar si en la planta *K. delagoensis* puede llegar a ser hospedera de bacterias rizosféricas del género *Bacillus* con capacidad antagonica contra hongos fitopatógenos causantes del damping-off.

III. Objetivos.

3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antifúngica de aislados bacterianos obtenidos de la rizósfera de *Kalanchoe delagoensis* contra hongos fitopatógenos, asociados a la enfermedad del “damping- off” y su uso como mejoradoras de crecimiento vegetal.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* mediante ensayo dual de los aislados bacterianos provenientes de la rizósfera de *Kalanchoe delagoensis* contra *Phytophthora capsici*, *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, causantes del marchitamiento del tallo
2. Analizar la capacidad de los aislados para reducir la infección por *Fusarium* sp. en germinados de tomate (*Solanum lycopersicum*) así como su capacidad para promover el crecimiento vegetal.
3. Identificar molecularmente el género de las bacterias aisladas de la rizósfera de *Kalanchoe delagoensis* con mejor actividad de biocontrol.
4. Determinar la producción de ácido indolacético, sideróforos, ACC desaminasa, solubilización de fosfato y fijación biológica de nitrógeno de los aislados bacterianos.

VI. Material y Métodos.

4.1 Sitio de estudio

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, lo correspondiente a la experimentación con plántulas *in vivo* fue realizado en el invernadero perteneciente al mismo laboratorio, ubicado en las instalaciones de dicha facultad.

4.2 Material biológico.

Los fitopatógenos *Phytophthora capsici* (Aislamiento en Nuevo León, México), *Fusarium oxysporum* (Aislamiento en Jalisco, México), *Rhizoctonia solani* (Aislamiento en Guanajuato, México) y la variedad de *Fusarium* identificada como *Fusarium sp.* (Aislamiento en Sonora, México), fueron proporcionadas por el laboratorio de investigación de la empresa Quimia S.A. de C.V. (Sinaloa, México), al igual que la bacteria de *Bacillus subtilis* (Q11) utilizada como control en los ensayos de antagonismo y bioprotección. La bacteria MA06 que se utilizó como control para la evaluación de promoción de crecimiento vegetal, fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola con su efectividad probada en tomate (*S. lycopersicum*) y pimiento (*C. annuum* var. Pimiento) (Martinez y col. 2013). La variedad de semilla certificada que se utilizó fue de jitomate (*S. lycopersicum* var. Saladet semilla Alfredo (Falcon Seeds S. de R.L. de C.V.) (Figura 6).



Figura 9. Material biológico. **(a)** *Solanum lycopersicum* var. Saladet semilla Alfredo **(b)** *Fusarium* sp. en PDA.

Fue realizado un microcultivo de la cepa *Fusarium* sp., proporcionada por la empresa Quimia para la verificación de su género. De tal manera que se preparó una cámara húmeda con ayuda de una placa Petri de vidrio 9 cm, una gasa húmeda y una varilla de vidrio en donde fue colocado el portaobjetos, fue utilizado agar papa dextrosa (APD) (Preparado según Urcia y Guevara, 2002) y este fue inoculado con una pequeña cantidad de fitopatógeno en las orillas, se colocó un cubreobjetos esterilizado por calor sobre el bloque y se puso en incubadora a 27 °C (Fisherbrand refrigerated incubator mod. 3724) por 5 d. Habiendo transcurrido el tiempo, se realizó una tinción simple con azul algodón (Golden Bell, Jal., México) al cubreobjetos, para un mejor contraste en las imágenes a través del microscopio (Zeiss, Primostar acoplado a una cámara stemi 305) (Chukwuebuka y Perpetua en el 2021).

4.3 Obtención de aislados bacterianos

Para la obtención de bacterias provenientes de la rizósfera de la planta *K. delagoensis*, fue realizado un muestreo aleatorio simple de diez ejemplares de plantas sanas sin visibilidad de algún daño, de las cuales se tomaron muestras de

suelo de su rizósfera. Las plantas estaban ubicadas dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma de Querétaro, con las siguientes coordenadas: 20°35'29.1"N 100°24'40.5"W. Realizado en el mes de agosto de 2022.

El aislamiento de bacterias se realizó por dilución y siembra en placa de agar nutritivo (MCD LAB, Oax., México) por extensión (campana de flujo laminar vertical Lumistell Clase II Tipo A2) para lo cual, 1 g de muestra compuesta fue disuelta en un tubo de ensaye con 9.0 mL de agua estéril, pasteurizándose a 80 °C por 10 min, para la obtención de bacterias formadoras de endospora, etiquetándose como la primera dilución decimal o 10^{-1} , se realizaron diluciones sucesivas 10^{-2} y 10^{-3} . Posteriormente fueron sembradas alícuotas de 100 μ L en placas de agar nutritivo, incubándose a 28 °C \pm 2 por 24 h (Incubadora ECOSHEL 9025E) (Chávez-Ambriz y col., 2016) y se calcularon las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo rizosférico (UFC g^{-1}_{suelo}).

Se caracterizaron las colonias obtenidas en cada placa en función de sus aspectos morfológicos de las colonias como: su forma, borde, elevación, color y tipo de superficie. Las colonias seleccionadas fueron purificadas en placas de agar nutritivo por estría de esta manera se obtuvieron aislados axénicos para los siguientes ensayos, mismos que fueron almacenados por el método de conservación en papel filtro a -17 °C \pm 2 (Calvo y Zúñiga, 2010; Sosa-López y col., 2011).

Se analizaron las propiedades fisicoquímicas al suelo rizosférico perteneciente a las plantas de *K. delagoensis* fue evaluado utilizando las distintas metodologías de la NOM- 021-SEMARNAT-2000 para pH, conductividad eléctrica, textura, porcentaje de materia orgánica y carbono (SEMARNAT, 2000).

4.4 Capacidad de inhibición *In vitro*

4.4.1 Interacción dual entre hongos causantes del “damping- off” y aislados bacterianos

Las cepas bacterianas antagonistas fueron seleccionadas mediante ensayos de cultivo dual contra las especies de *P. capsici*, *Fusarium sp.*, *F. oxysporum* y *R. solani*. Fueron colocados tampones de micelio de 2 mm de diámetro en el centro de la caja Petri que contenía medio APD (Figura 10). Posteriormente, se inocularon los aislados bacterianos mediante dos líneas paralelas colocando al disco micelial en el centro de la caja. El APD sin inóculo bacteriano como control negativo y como control positivo *Bacillus subtilis* Q11. Todas las placas se incubaron (Fisherbrand refrigerated incubator mod. 3724) a 28 °C ± 2. Se consideró una unidad experimental a cada rayadura de la bacteria confrontar y se realizaron cuatro placas por tratamiento (Martinuz, 2020; Rong y col., 2020). Se inició con *F. oxysporum*, seguido de *R. solani*. Se realizó un escrutinio de cepas, eligiendo solo las que presentaran un IF > 50% para ser probadas con *P. capsici* y *Fusarium sp.*

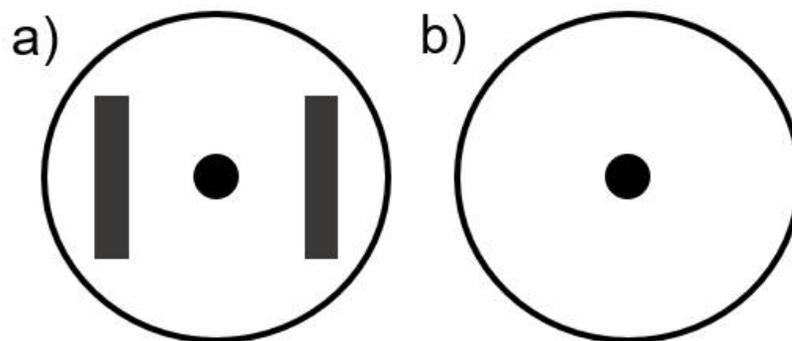


Figura 10. Ensayo de cultivo dual para la determinación de actividad inhibitoria de bacterias sobre hongos. (a) Inoculación de hongo con cepa bacteriana o control positivo. (b) Inoculación de hongo en placa control negativo. Imagen modificada de (Martinuz, 2020).

El porcentaje de inhibición fúngica (IF) se calculó según la siguiente fórmula, considerándose aceptable una inhibición superior al 50% (Kumar y col., 2012).

$$IF = \frac{C - T}{C} (100)$$

Donde:

IF, Porcentaje de inhibición fúngica.

T, crecimiento radial de colonia fúngica con tratamiento (mm).

C, Crecimiento radial de colonia fúngica control (mm).

4.4.2 Ensayo en placa de agar sangre

Se utilizaron placas de agar sangre comercial de 9 cm de diámetro marca BD (Becton, CDMX, México) compuestas por peptona de caseína 15 gL⁻¹, peptona de soya 5 gL⁻¹, cloruro de sodio 5, gL⁻¹ Agar 15 gL⁻¹ y sangre de carnero 50 mL⁻¹. Cada uno de los aislados fue sembrado en una placa de agar sangre en pequeños puntos con el asa, separados uno del otro para formar una cuadrícula por duplicado y se dejaron incubar por 24 h a 29 °C ± 2 (Incubadora ECOSHEL 9025E). Se tomaron positivas las bacterias que presentaron hemolisis. De manera presuntiva, esta prueba indica la presencia de lipopéptidos, mismos que pudieran ser utilizados en el antagonismo entre los hongos y las cepas aisladas (Chávez-Castillo y col., 2006).

4.5 Capacidad de biocontrol en germinados de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) por *Fusarium* sp.

Solo fue evaluada la cepa *Bacillus* PEu *Fusarium* sp. Este ensayo fue realizado conforme a Adenji y colaboradores en el 2020 con algunas modificaciones; primeramente, fueron esterilizadas las semillas de tomate (*S. lycopersicum*) mediante agitación en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex, N.L., México) al 0.75 % durante 1 min para después realizar enjuagues con agua destilada estéril, repitiendo el procedimiento en cinco ocasiones, posteriormente, se pusieron a germinar en placas de medio Murashigue y Skoog (Sigma-Aldrich Química, Alemania) adicionado con sacarosa al 1% (Golden Bell, Jal., México), una vez abierta la cubierta seminal fueron inoculadas con una suspensión bacteriana.

La suspensión bacteriana fue realizada de la siguiente forma; la bacteria se dejó crecer en cajas Petri con AN a $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 h (Incubadora de temperatura constante ECOSHEL 9025E), el crecimiento bacteriano en una solución de NaCl al 0.5% (Marcon Chemicals, Qro., México) para después llegar a una densidad óptica (OD) de $0.75 \sim 1 \times 10^7$ células mL^{-1} utilizando una solución de goma arábiga al 5% (Meyer, CDMX, México). Así pues, las semillas previamente germinadas fueron puestas en agitación constante 120 rpm (incubadora con agitación IKA KS 3000 i control) a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 h con la suspensión bacteriana. Una vez transcurrido el tiempo las semillas fueron colocadas alrededor del crecimiento de fitopatógeno (Figura 11), cabe destacar que el disco de micelio joven de 2 mm fue colocado en el centro de la caja al mismo tiempo que las semillas fueron puestas a germinar.

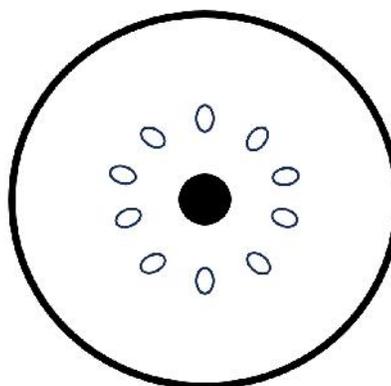


Figura 11. Ensayo *in vitro* con semillas de jitomate (*S. lycopersicum*) y el fitopatógeno. Donde (○) Semillas de tomate (*S. lycopersicum*) y (●) es *Fusarium* sp.

Para el ensayo cada placa fue montada con 10 semillas fue considerada como una unidad experimental cada semilla germinada y fueron realizadas cinco repeticiones de caja Petri por tratamiento (en total 50 semillas a evaluar).

Las variables evaluadas fueron los síntomas de infección por el fitopatógeno evaluando el daño con una numeración del uno al cinco, siendo cinco el valor con mayor daño sobre el germinado (Figura 12), se describen de la siguiente manera:

- 1.- No se presenta daño en el germinado;

- 2.- Pequeño cambio de color, debido a una leve oxidación en la radícula;
- 3.- Existe un daño notorio sin embargo es posible la recuperación para el desarrollo de la planta;
- 4.- Hay una pudrición notoria en el final de la radícula donde empieza la pudrición;
- 5.- La pudrición de la semilla es completa cubriendo el cotiledón.

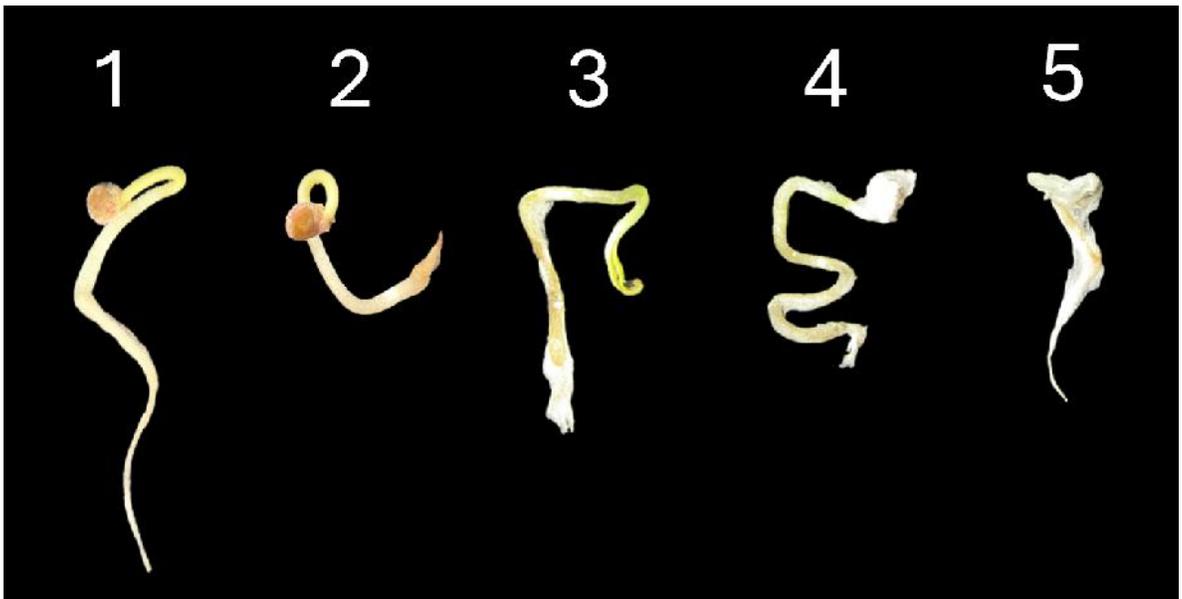


Figura 12. Niveles de daño en germinados de semilla (el número indica el nivel de daño).

Cabe mencionar que como control se utilizaron semillas sin inocular, así como del fitopatógeno sin la interacción de la semilla, de igual forma se evaluó la interacción entre semilla y bacteria según el caso, el control positivo fue como en el cultivo dual *B. subtilis* Q11 (Chávez-Ambriz y col., 2016; Wiyono y col., 2021).

4.8 Identificación de los aislados con actividad antagonista por secuenciación y análisis del gen 16S ARNr

Los aislados que presentaron mayor actividad antagónica contra los distintos hongos fitopatógenos fueron mediante la amplificación y secuenciación de gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal para el cual fue utilizado el kit Quick-DNA™ Miniprep de la marca Zymo (ZyResearch, Irvine, CA, USA) obteniendo así el ADN (Weisburg y col.,1991).

Después se realizó una electroforesis utilizando con gel de agarosa al 1% (Meyer, CDMX, México) y 100 mL de TAE (Dicmalab, CDMX, México), el gel una vez seco fue colocado dentro de la cámara de electroforesis, para después llenarla con la solución de TAE con la que fue preparado el gel. En cada pocillo fue cargado con 2 µL de Coomassie fluor naranja (BioAdvanced Systems, CDMX México) para electroforesis y 2 µL de muestra. Cabe mencionar que de igual manera fue cargado un marcador de 1,500 bp (BioAdvanced Systems S.A. de C.V., CDMX México). Posteriormente, fue conectada a una fuente de poder de 80 volts y se dejó por 30 minutos; una vez transcurrido el tiempo, el gel fue colocado en una lámpara UV, de tal manera que se comprueba de manera cualitativa la correcta extracción de ADN (Pérez-Cano, 2014).

Una vez comprobada la calidad de la extracción de ADN, siguiendo la metodología propuesta por Monciardini y colaboradores en el 2002 utilizando los Primer A fd1 (secuencia de 5´a 3´: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) y Primer B rD1 (secuencia de 5´a 3: AAG GAG GTG ATC CAG CC) utilizando reactivos para PCR de la marca (Sigma- Aldrich, S., Alemania). Las muestras fueron introducidas a un termocilador (Thermo scientific MaxyGene II) con una temperatura para el rompimiento de puentes de hidrogeno de 94° los primeros 3 minutos, con una disminución a 50° los siguientes 30 segundos para la alineación de primers, a continuación de 2 minutos a 72° para la acción de la polimerasa y la amplificación, por último, el ciclo termina con la disminución de temperatura durante 4 minutos,

dando un total de 35 ciclos. El producto resultante de ~1500 pb, fue enviado para secuenciación a la empresa MACROGEN INC (Seúl, República de Corea).

Después de la secuenciación del ADN, las secuencias de nucleótidos se enviaron a la base de datos del NCBI utilizando el servidor NCBI BLAST. Fueron elegidas distintas secuencias con porcentajes de similitud a las obtenidas en la investigación, superiores a un 98%, todas las secuencias se alinearon con el software MEGA10 para la construcción del árbol filogenético por el método valleciano, fueron utilizadas las siguientes cepas: *Bacillus halotolerans* XH-1, *Bacillus halotolerans* KKD1, *Bacillus subtilis* GUCC4, *Bacillus megaterium* Jz11, *Peribacillus muralis* G25-68 chr, *Peribacillus simplex* SH-B26, *Bacillus cereus* MO2, *Bacillus thuringiensis* HER1410, *Bacillus toyonensis* HA0190, *Bacillus cereus* A01, (Tamura y col., 2013).

4.6 Pruebas Bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal

4.6.1 Solubilización de fosfato

Cada uno de los aislados bacterianos fue sembrado en cajas Petri de 9 cm de diámetro de agar con medio NBRIP-BPB (glucosa 10 gL⁻¹(Meyer, CDMX, México), Ca₃(PO₄)₂ 5 gL⁻¹ (J.T. Baker, Edo. de Mex, México), MgCl₂ 6H₂O 5 gL⁻¹ (Golden Bell, Jal., México), MgSO₄ 7H₂O 0.25 gL⁻¹, KCl 0.20 gL⁻¹ (J.T. Baker, Edo. de Mex, México), (NH₄)₂SO₄ 0.10 gL⁻¹(Meyer, CDMX, México), 18 gL⁻¹ de agar (MCD LAB, Oax., México) y BPB (azul de bromofenol) 25 mgL⁻¹ (Hycel, Jal., México), Los cultivos se incubaron a 29 °C ± 2 (Incubadora ECOSHEL 9025E) por 120 h. La formación de un halo indica la solubilización de fosfatos; el cambio de color de azul a amarillo dio como resultado una prueba positiva y se realizó por duplicado (Lara y col., 2011; Tejera-Hernández y col., 2013).

4.6.2 Producción de ácido indolacético

La producción de ácido indolacético (AIA) se evaluó sembrando las cepas en caldo nutritivo (MCD LAB, Oax., México) suplementado con triptófano (1 g L^{-1}) (Golden Bell, Jal., México) en tubos de ensayo de 10 mL durante 120 h a 150 rpm y $29 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (incubadora con agitación IKA KS 3000 i control). El sobrenadante que se recuperó mediante centrifugación a 3000 Xg (Hera Scientific 4000 rpm) se mezcló 1 mL con 2 mL del reactivo de salkowski mezcla de H_2SO_4 (J.T. Baker, Edo. de Mex, México) y FeCl_3 (Meyer, CDMX, México) 1:1, siendo leído a 530 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Comintec haz simple Halo XB-10 / VIS-20). La curva de calibración fue de 3.6 a 25.2 mg L^{-1} de AIA (Chávez-Ambriz y col., 2016).

4.6.3 Actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC desaminasa)

Para la prueba de actividad del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxilo conocido como ACC desaminasa (Sigma-Aldrich Química, S., Alemania), se realizó lo propuesto por Dworkin y Foster en (1958). Las bacterias fueron sembradas en el medio DF (Dworkin y Foster), en cajas Petri de 9 cm de diámetro por estría, por duplicado. El medio DF que contiene: KH_2PO_4 4 gL^{-1} (Golden Bell, Jal., México), Na_2HPO_4 6 gL^{-1} (Meyer, CDMX, México), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 gL^{-1} , glucosa 2 gL^{-1} , ácido glucónico 2 gL^{-1} (Golden Bell, Jal., México), ácido cítrico 2 gL^{-1} (Meyer, CDMX, México), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mgL^{-1} (Meyer, CDMX, México), H_3BO_3 10 mgL^{-1} (Meyer, CDMX, México) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 11.19 mgL^{-1} , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 124.6 mgL^{-1} (Meyer, CDMX, México) CuSO_4 78.2 mgL^{-1} (Golden Bell, Jal., México), MoO_3 10 mgL^{-1} (Meyer, CDMX, México) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.13 gL^{-1}) (Meyer, CDMX, México), las placas fueron incubadas (Incubadora ECOSHEL 9025E) por 72 h a $29 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Una vez transcurrido el tiempo anterior las bacterias que presentaron crecimiento, se sembraron nuevamente en el medio DF, con la misma fuente de nitrógeno. Al terminar esta segunda etapa de resiembra, las bacterias que crecieron se volvieron a cultivar en medio DF sustituyendo la fuente de nitrógeno con ACC desaminasa 0.13 gL^{-1} , todo en las mismas condiciones de incubación. Se consideró

un resultado positivo en aquellas bacterias que presentaron crecimiento en el medio con esta última fuente de nitrógeno.

4.6.4 Fijación biológica de nitrógeno

La prueba de fijación biológica de nitrógeno indica la habilidad de las bacterias para para fijar nitrógeno atmosférico en condiciones microaerófilas (condiciones de oxígeno bajas), para ello los aislados bacterianos fueron inoculados en tubos vidrio tapados con 4 mL de medio de cultivo en tubos con medio NFB (por sus siglas en ingles caldo sin nitrógeno) (pH:5.5): ácido málico 3 gL⁻¹ (Meyer, CDMX, México), glucosa 2 gL⁻¹, K₂HPO₄ 5 mL (sol.10%) (Golden Bell, Jal., México), MgSO₄ 7 H₂O 2 mL (sol.10%), NaCl 1 mL (sol.10%); CaCl₂ 2 H₂O 2 mL (sol.1%)(Reactivos químicos Monterrey, N.L., México), azul de bromotimol 2 mL (Reactivos químicos Monterrey, N.L., México) en 0.5% de KOH 0.2N (Karal, Gto., México), solución de micronutrientes: 2 mL (Na₂Mo₄ 2 H₂O 0.2 gL⁻¹ (Reactivos químicos Monterrey, N.L., México), MnSO₄ 0.24 gL⁻¹ (Meyer, CDMX, México), H₃BO₃ 0.28 gL⁻¹, CuSO₄ 5 H₂O 0.01 gL⁻¹, ZnSO₄ 7 H₂O 24 mgL⁻¹, EDTA (Golden Bell, Jal., México) 4 mL (sol 1.64%) adicionado con Fe con (FeSO₄ Meyer, CDMX, México). Fueron incubados (Incubadora de temperatura constante ECOSHEL 9025E) por 5 d a 29 °C ± 2, transcurrido este tiempo, la formación de una película subsuperficial se consideró un resultado positivo (Mantilla-Paredes y col., 2009).

4.6.5 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se evaluó en medio CAS con 1 mmolL⁻¹ FeCl₃ 6 H₂O, 10 mmolL⁻¹ HCl (Jalmek Científica, N.L., México), cromo azurol S 26.3 mmolL⁻¹ (Sigma-Aldrich Química, S., Alemania), HDTMA con 39.62 mmolL⁻¹ (Meyer, CDMX, México) y 18 gL⁻¹ de agar, se dejó solidificar para, posteriormente, cubrir con una capa fina la caja con 6 mL de agar nutritivo. Cuando estuvieron listas las placas dobles, los aislados bacterianos se sembraron por duplicado en condiciones de

incubación (Incubadora ECOSHEL 9025E) de 29 °C ± 2 por 24 h. Se consideraron positivas las cepas que presenten un halo en tonos naranjas (Alexander y Zuberer, 1991; Hu y Xu, 2011).

4.7 Promoción de crecimiento vegetal en plántula en condiciones de invernadero.

Se evaluó la capacidad de promoción de crecimiento vegetal con los aislados con mayor capacidad antifúngica. Las semillas fueron esterilizadas como en la sección 4.7, la suspensión bacteriana con una concentración de 1×10^8 células mL⁻¹ en agitación constante 120 rpm (incubadora con agitación IKA KS 3000 i control) a 28° C por 4 h, después fueron puestas en almácigo utilizando como sustrato peat moss estéril; se consideraron por tratamiento cuatro lotes de 10 semillas cada uno, el control positivo se inoculó la bacteria llamada MA06 obtenida de un trabajo de investigación previo (Martinez y col., 2013) y como control negativo las semillas estériles el ensayo duro 25 d. Adicionalmente se midió la temperatura dentro del invernadero, el porcentaje de humedad y la radiación solar (Martínez-Ramón y col., 2013; Vinchira-Villagrana y col., 2021; Alves-Ribeiro y col., 2021; Malik y col., 2022).

Para el riego de las plantas se utilizó una solución de Steiner al 25% preparada tal como se menciona en la Tabla 6 (Magdaleno-Villar y col. 2006).

Tabla 6. Solución nutritiva Steiner para riego de plantas de tomate (Magdaleno-Villar y col. 2006).

Nutrimiento	Fuente	gL⁻¹ H₂O	Marca
N	KNO ₃	75	Meyer, CDMX, México
K	K ₂ SO ₄	100	
Ca	Ca(NO ₃) ₂	260	
Mg	MgSO ₄ • 7H ₂ O	125	
Zn	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0.2	
Fe	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O	•5	Karal, Gto., México
Cu	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.2	
P	H ₃ PO ₄	10 mL	Golden Bell, Jal., México
Mn	MnSO ₄ • 4H ₂ O	0.5	J.T. Baker, Edo. de Mex, México
B	Na ₂ B ₄ O ₇ • 10H ₂ O	1	Golden Bell, Jal., México

Las variables para evaluar fue el porcentaje de germinación (7 d después del primer brote), la altura del tallo de las plantas, así como su diámetro, biomasa total, biomasa del vástago húmeda (BV), biomasa vástago seca (BVS), biomasa del sistema radical (BSR) y biomasa del sistema radical seca (BSRS). El riego se realizó diariamente con la solución nutritiva steiner al 25% escrita en la Tabla 7. (Márquez y col., 2020; Alves-Ribeiro y col., 2021; Malik y col., 2022).

4.9 Análisis estadístico

Para los datos del antagonismo *in vitro* se realizó una prueba de normalidad “shapiro- wilk” para después realizar una comparación de medias (Tukey >0.05) a través de un “Análisis de la Varianza” (ANOVA) (Kouki y col., 2023). Los datos de las variables de promoción de crecimiento vegetal en plántula y la producción de ácido indolacético, igualmente fueron sujetos a un ANOVA, seguida de una prueba de Tukey para la comparación de sus respectivos tratamientos, en ambos casos con un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significancia del 0.05%, mediante el software libre INFOSTAT versión 2020. Se utilizará como complemento el programa EXCEL versión 2010 de la paquetería Office (Chávez-Ambriz y col., 2016; Wiyono y col.,2021).

V. Resultados y discusión.

5.1 Aislamiento de cepas bacterianas de *Kalanchoe delagoensis*

En el aislamiento de cepas bacterianas de la muestra de suelo rizosférico proveniente de *K. delagoensis* fue determinado el número de unidades formadoras de colonias bacterianas por gramo de suelo rizosférico fresco (UFC g⁻¹suelo), obteniendo un valor de $1.3 \times 10^5 \pm 0.5$ UFC g⁻¹suelo de bacterias cultivables y formadoras de endosporas.

Dicho resultado fue comparado con las unidades formadoras de colonias en la rizósfera de *K. delagoensis* de distintas especies vegetales como el pasto (*Paspalum vaginatum*), conocido por su resistencia y adaptabilidad a distintos entornos ecológicos, para el cual fue reportado un valor de 1.9×10^4 UFC g⁻¹ suelo (Vasconcelos-Fernandes y col., 2023). Al igual que especies de ecosistemas áridos como la suculenta *Plectranthus tenuiflorus* en donde fueron obtenidas 1.5×10^2 UFC g⁻¹ suelo (El-Deeb y col., 2013) y de la misma forma para el eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en el que fue informado el dato de 1.6×10^4 UFC g⁻¹ suelo (Obando- Castellanos y col., 2010).

De tal manera que el resultado obtenido en el presente trabajo obtuvo un valor de densidad de población superior a lo reportado por distintos autores en las plantas mencionadas con anterioridad, pudiendo ser por sus cualidades como planta invasora creando diferentes estrategias como el reclutamiento de microorganismos, además del contenido de materia orgánica (Tabla 8). Cabe mencionar que los recuentos cultivables del género *Bacillus* oscilan entre 1×10^3 y 1×10^6 UFC g⁻¹ suelo; por ende, el valor obtenido se encuentra en el rango de valores reportado (Vargas-Ayala y col., 2000).

Del total de bacterias obtenidas fueron seleccionadas 21 cepas bacterianas, por su morfología colonial, los tamaños de colonia variaron de entre 0.7 mm con la

cepa nombrada GEu hasta los 8.0 mm de diámetro que presento TEu lo rizosférico, las cuales fueron seleccionadas por su diferente morfología colonial (Tabla 7).

Todos los aislados presentaron forma circular, los tonos de color de las colonias variaron entre tonos blancos, cremas hasta amarillos, el 52 % de las colonias no presentaron elevaciones; así mismo, el 86 % de las bacterias presento borde entero y el 57 % una consistencia seca, la presencia de brillo fue relacionado con la superficie lisa de la colonia y de igual manera, las bacterias que presentaron superficie rugosa tenían consistencia seca.

Los resultados de la morfología colonial coinciden con lo obtenido por Calvo y Zúñiga en el 2010, en donde describieron que la morfología colonial de *Bacillus* spp. corresponde a formas circulares, en diferentes tonos blancos y elevaciones planas o convexas. Se han reportado distintas especies de *Bacillus* pueden ser de colores crema, blanco hasta distintos tonos de anaranjado como *B. atropheus* (Logan y Halket, 2011), las especies pertenecientes al grupo *B. cereus* presentan una superficie lisa, mientras que grupos como *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. mycoides* son de superficie rugosa, cabe mencionar que *B. amyloliquefaciens* al igual que las anteriores especies mencionadas presentan consistencia seca (Teodoro- Rocha y col., 2023), por consiguiente, algunos de los aislados a estudiar que presentan estas características podrían ser parte de este género, sin embargo, la morfología colonial puede estar influenciada por el sustrato o el contenido de nutrientes (Calvo y Zúñiga, 2010).

Tabla 7. Características morfológicas coloniales de los aislados bacterianos.

AIS	D (mm)	F	B	SUP	CITA	Color	BR	P	ELE
AEu	2.0	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	Cnxa
BEu	2.0	C	E	Lisa	Cremosa	Blanca	B	M	Cnxa
CEu	5.0	C	E	Rugosa	Seca	Blanquecina	M	M	P
DEu	7.0	C	E	Rugosa	Seca	Crema	M	M	P
EEu	2.0	C	E	Lisa	Cremosa	Blanca	M	M	P
FEu	1.7	C	O	Rugosa	Seca	Amarillenta	M	M	P
GEu	0.7	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	Cnxa
HEu	3.0	C	E	Rugosa	Seca	Blanca	M	M	P
IEu	4.0	C	E	Rugosa	Seca	Blanquecina	M	M	P
JEu	1.2	C	E	Rugosa	Seca	Crema	M	M	Cnxa
KEu	1.1	C	E	Rugosa	Seca	Amarillenta	M	M	Cnxa
LEu	2.0	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	Cnxa
MEu	2.0	C	E	Rugosa	Seca	Blanquecina	M	M	P
NEu	1.5	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	Cnxa
OEu	1.3	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	Cnxa
PEu	4.0	C	O	Rugosa	Seca	Blanca	M	T	P
QEu	2.0	C	O	Rugosa	Seca	Amarilla	M	M	P
REu	1.8	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	P
SEu	6.0	C	E	Rugosa	Seca	Blanquecina	M	M	P
TEu	8.0	C	E	Lisa	Cremosa	Crema	B	M	P
UEu	3.0	C	E	Rugosa	Seca	Amarillenta	M	M	P

AIS=Aislado; D= Diámetro en mm; F= Forma; B= Borde; SUP= Superficie; CITA= Consistencia; BR= Brillo; P= Paso de luz; ELE; Elevación; C= Circular; E=Entero; O=Ondulado; B= Brillante; T= Transparente; M= Mate; Cnxa= Convexa; P= Plana.

5.2 Propiedades de suelo rizosférico de *K. delagoensis*

Con la finalidad de conocer algunas propiedades respecto a la fertilidad del suelo donde de manera natural se encontraba la planta de estudio (*K. delagoensis*) fueron evaluadas distintas propiedades como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del análisis de propiedades físicas y químicas del suelo rizosférico de *K. delagoensis*.

Indicador	Metodología	Valor
Arena	Bouyoucos	38 %
Limo	Bouyoucos	36 %
Arcilla	Bouyoucos	26 %
pH	En agua 1:2 (potenciómetro)	7.4
Conductividad eléctrica	Conductímetro	35.66 mV
% Carbono orgánico	Walkley y Black	1.26 %
% Materia orgánica	Walkley y Black	2.18%

Es un suelo con clase textural franco, de igual manera fue medido su porcentaje de materia orgánica del mismo suelo obtenido un valor de 2.18 % clasificado al suelo como contenido medio según la norma oficial mexicana.

La relación de los microorganismos está estrictamente relacionada con el porcentaje de materia orgánica y a su vez con el ciclo energético y el intercambio de nutrientes en el suelo (Zhao y col., 2024). Pese a que el contenido de materia orgánica es considerado bajo según la norma, un suelo de textura franca contiene menos contenido de materia orgánica que una textura más arcillosa; a pesar de ello, estos suelos son fértiles para el desarrollo agrícola y cuentan con buenas reservas de nutrientes por lo que era de esperarse contar con un buen desarrollo de *K.*

delagoensis y un valor de unidades formadoras de bacterias cultivables, específicamente del género *Bacillus* dentro del rango reportado en distintas literaturas (Jindaluang y col., 2013).

Su pH fue de 7.4 respectivamente, clasificándolo como un suelo medianamente alcalino. El pH puede considerarse un indicador de la disponibilidad de nutrientes, al tener un pH alcalino tiene mayor abundancia de iones OH⁻ lo que se puede traducir en la precipitación de nutrientes como el zinc, hierro o magnesio de tal manera que no se encuentran disponibles para la nutrición de las plantas (Cremona y Enriquez, 2020). El valor obtenido de bacterias cultivables y formadoras de endosporas demuestra que pueden existir microorganismos que tuvieron un papel clave en la nutrición de las plantas muestreadas con distintos mecanismos para el aprovechamiento de nutrientes un ejemplo de esto es la producción de sideróforos, la fijación de nitrógeno, entre otros.

5.3 Interacción dual *in vitro* entre hongos causantes del “damping- off”

Después del aislamiento de bacterias, el análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo de donde fueron aisladas; fueron evaluadas las capacidades antagónicas de los 21 aislados *in vitro* con el fin de encontrar posibles agentes de biocontrol para la enfermedad del damping- off causada por distintos hongos fitopatógenos.

Uno de estos fitopatógenos es *Fusarium* sp. este, fue aislado y proporcionado por la empresa Quimia SA. De C.V. por lo que se realizó un microcultivo para comprobar el su género del hongo y como resultado fueron obtenidas a través del microscopio las siguientes imágenes (Figura 13), en donde fue posible ver sus características morfológicas más importantes como las hifas de clamidosporas en cadena y sus macroconidios característicos.



Figura 13. Microcultivo de *Fusarium* sp. Mc= Microconidios, también conocidos como conidios septados; H= hifas, también llamadas clamidosporas en cadena.

Para el análisis de la interacción dual in vitro se utilizaron a *F. oxysporum* y a *R. solani* para realizar un escrutinio de los aislados con potencial antagónico y como control positivo a *Bacillus subtilis* Q11. Primeramente, fue utilizado *F. oxysporum* frente a las 21 cepas aisladas, dando como resultado, una diferencia significativa entre los aislados evaluados según la comparación de medias (Tabla 9). El porcentaje de inhibición fúngica (IF) más alto fue obtenido por la bacteria nombrada PEu con un 63%, de igual manera se consideraron estadísticamente iguales las bacterias REu, CEu, HEu, SEu y AEu.

De la misma manera, fue evaluado *R. solani*, a diferencia de *F. oxysporum* de manera general se obtuvieron porcentajes más altos de inhibición, por otro lado, la bacteria que disminuyó el crecimiento radial de hasta un 72.36 % fue la nombrada CEu y al igual que el caso anterior también REu, PEu, HEu, SEu y AEu son estadísticamente iguales a este tratamiento (Tabla 8).

Por consiguiente, solo PEu, REu, CEu, HEu, SEu y AEu, fueron evaluadas contra *P. capsici* y *Fusarium* sp. (Figura 14). De tal manera que, para el ensayo realizado con *P. capsici* solo PEu presentó un porcentaje de inhibición de casi 69 %, cercano al control positivo. Por otra parte, para la evaluación de *Fusarium* sp. PEu y REu superan a Q11 (Figura 14). En resumen, solo PEu puede considerarse con

actividad biofungicida de amplio espectro, superando en todos los casos el 50% de inhibición (Tabla 9).

Las bacterias de biocontrol más reportadas pertenecen al género *Bacillus* (Herrera-Quintero y col., 2020) un ejemplo de ello es *B. amyloquiquefaciens* y *B. subtilis* que han sido probados contra distintos fitopatógenos como *A. alternata*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides* obteniendo inhibiciones en cultivos duales superiores al 50% (Azeem y col., 2022), *B. valezensis* de igual manera contra *R. solani* y *S. Sclerotium* (Yu y col., 2023), *Bacillus safensis* contra *M. oryzae* (Rong y col., 2020). Los mecanismos de acción son diversos como la producción de enzimas, los compuestos volátiles, la interrupción de la detección de quórum, la competencia por nutrientes y espacio, por mencionar algunos (Arshad-Ali y col., 2024) sin embargo, de manera teórica debido al alcance de la investigación solo podemos afirmar que distintas especies de *Bacillus* han sido reportados debido a sus metabolitos secundarios y sus compuestos antagonistas (Poveda y Gonzales-Andrés, 2021).

Tabla 9. Antagonismo *in vitro* de las cepas aisladas frente a *R. solani*, *F. oxysporum* *Phytophthora capsici* y *Fusarium* sp.

Aislado	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. capsici</i>	<i>Fusarium</i> sp.
PEu	63.01 a ⁺	65.03 ab	68.85 a	68.56 a
REu	58.71 a	61.86 abc	17.57 b	68.42 a
Q11	56.42 ab	69.19 ab	71.88 a	61.81 ab
CEu	53.49 abc	72.36 a	21.52 b	30.74 cd
HEu	53.23 abcd	61.39 abc	16.72 b	46.72 bc
SEu	50.56 abcde	60.47 abc	19.43 b	27.65 de
AEu	34.46 abcdef	71.11 a	4.7 b	14.42 e
OEu	24.25 bcdefg	6.38 d	NA	NA
MEu	25.58 cdefg	2.89 d	NA	NA
LEu	24.92 cdefg	18.32 bcd	NA	NA
DEu	23.51 defg	6.74 d	NA	NA
BEu	22.40 efg	0.87 d	NA	NA
NEu	21.13 efg	17.20 bcd	NA	NA
GEu	21.01 efg	0.81 d	NA	NA
QEu	18.57 ef	20.39 abcd	NA	NA
TEu	17.69 ef	10.47 cd	NA	NA
UEu	17.42 ef	9.96 cd	NA	NA
EEu	15.07 fg	30.82 abcd	NA	NA

FEu	15.06 fg	0.98 d	NA	NA
IEu	14.94 fg	18.26 bcd	NA	NA
JEu	6.70 fg	0.40 d	NA	NA
KEu	4.21 g	47.02 abcd	NA	NA
DMS _{0.05}	29.86	51.99	20.43	16.26
CV (%)	24.94	42.93	15.55	15.45

NA= no aplica; DMS _{0.05} =diferencia mínima significativa (Tukey, 005);
CV=coeficiente de variación; *Medias (n=4) con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 005).

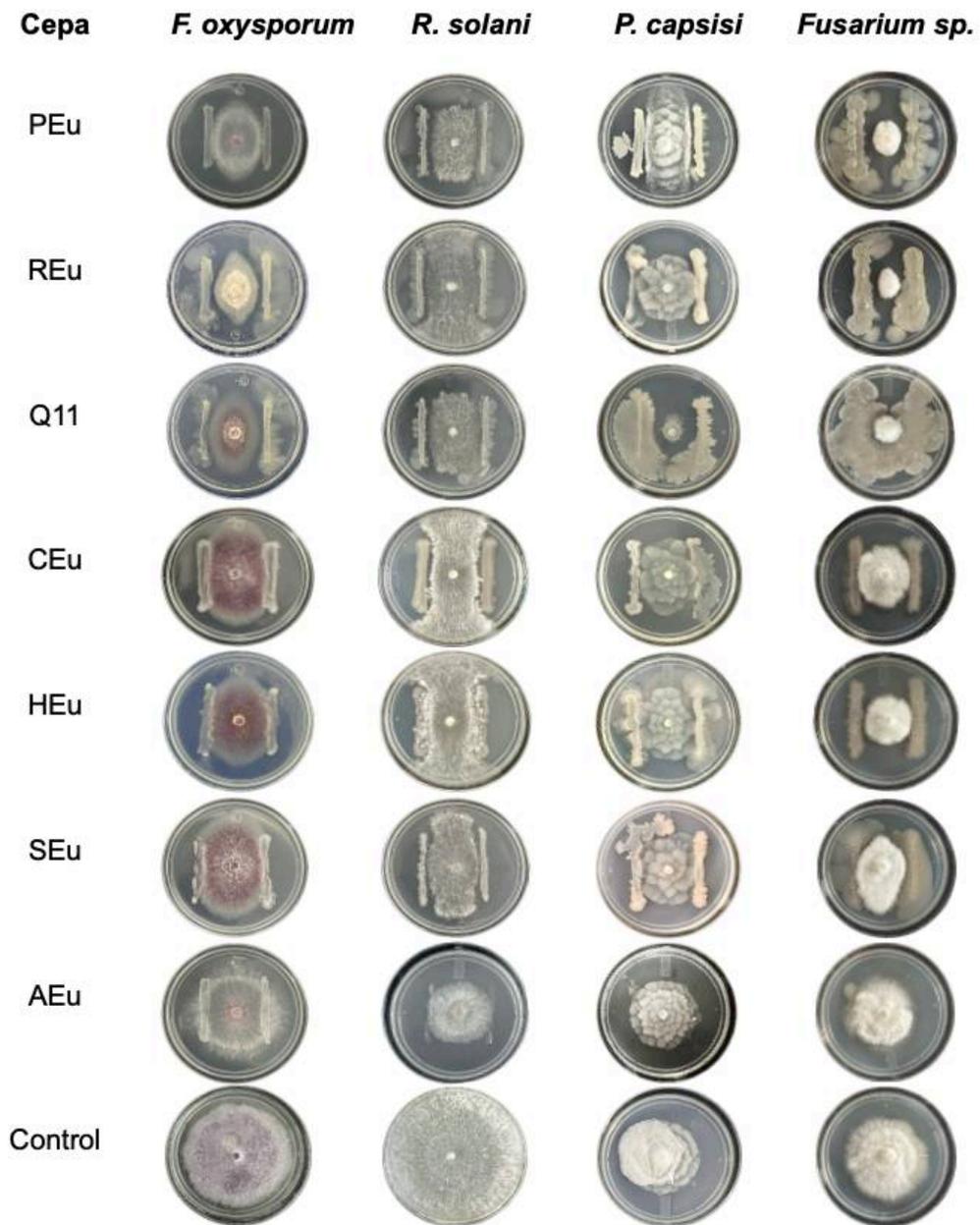


Figura 14. Efecto antagónico de cepas de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsisi* y *Fusarium sp.* mediante ensayos duales.

5.3.1 Prueba de hemólisis

La prueba de hemólisis es un ensayo que originalmente está diseñado para el análisis clínico, sin embargo, en el sector agrícola está relacionado con la producción de proteínas o lipopéptidos producidos por diferentes tipos de microorganismos que favorecen la lisis de glóbulos rojos (Buxton, 2016). De tal manera que el desarrollo de estos metabolitos secundarios puede influir en el antagonismo entre la bacteria que los produce y en este caso, en particular los fitopatógenos evaluados.

A manera de resultados, dentro de las 21 bacterias aisladas, CEu, HEu, IEu, DEu, PEu, y SEu dieron positivo a esta prueba cualitativa, como se pudo observar en la Figura 15. Comparado los ensayos de cultivo dual realizado con los cuatro fitopatógenos, cuatro de los seis resultados positivos presentaron porcentajes de inhibición sobresalientes al resto, por lo que un estudio más especializado puede ser un área de oportunidad para conocer si los aislados producen metabolitos que impidan el crecimiento de los distintos hongos probados, el uso de este tipo de agar ayuda en la detección rápida y cualitativa de bacterias antagonistas contra distintos tipos de fitopatógenos debido a la posible producción de lipopéptidos, de entre los cuales solo los aislados nombrados como CEu, HEu, PEu y SEu.

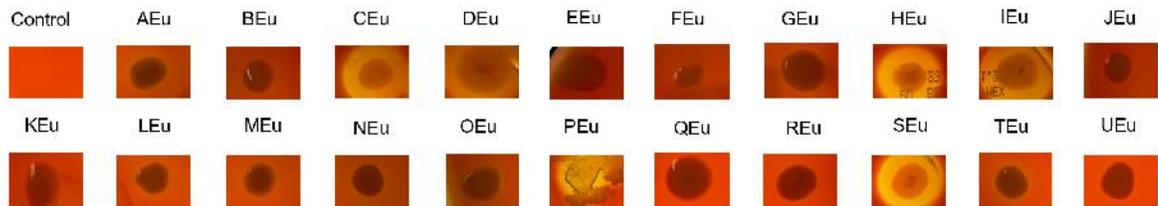


Figura 15. Relación de placa de agar sangre y aislados bacterianos después de 24 h del sembrado.

Un estudio realizado por Amaria y colaboradores en el 2023 indico que esta prueba no necesariamente indica que la cepa aislada que presente algún tipo de lisis celular puede ser patógena para el entorno ecológico al que se desea introducir, puesto que comprobaron de 68 resultados positivos de hemolisis solo el 7 % presentaron hipersensibilidad en hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum L*), de igual manera, Mogrovejo y colaboradores en el 2020, reportaron 35 aislamientos bacterianos que presentaron actividad hemolítica, solo 5% de estos, presento dicha actividad con extractos celulares de eritrocitos, por lo tanto, existe prueba de que para el área de la agrotecnología, esta prueba no está relacionada con patogenicidad del fenotipo. Cabe mencionar que, aunque en los resultados de inhibición *in vitro* y esta prueba hemolítica no obtuvieron relación con el total de los aislados, esta es solo una prueba cualitativa.

5.4 Identificación por 16S ARNr de los aislados con actividad antagonista y promotora del crecimiento vegetal

Fue realizada la identificación por medio del 16S ARNr de las seis bacterias con potencial antagónico (PEu, REu, SEu, HEu, CEu y AEu). Para comprobar la correcta extracción de ADN de las bacterias a secuenciar fue realizada con éxito la electroforesis de las muestras. Para esto es común utilizar el polirribonucleótido conocido como ADNr 16S de aproximadamente 1,500 pb, que debido a que procede de subunidades pequeñas de los ribosomas es altamente conservado, por lo que es utilizado para obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio y Mendoza, 2004). Como se puede observar la electroforesis (Figura 16) la extracción de las muestras de ADN fue realizada de manera correcta para su posterior secuenciación y cargados en la base de datos GenBank perteneciente a el National Institutes of Health (NIH) (Tabla 10).

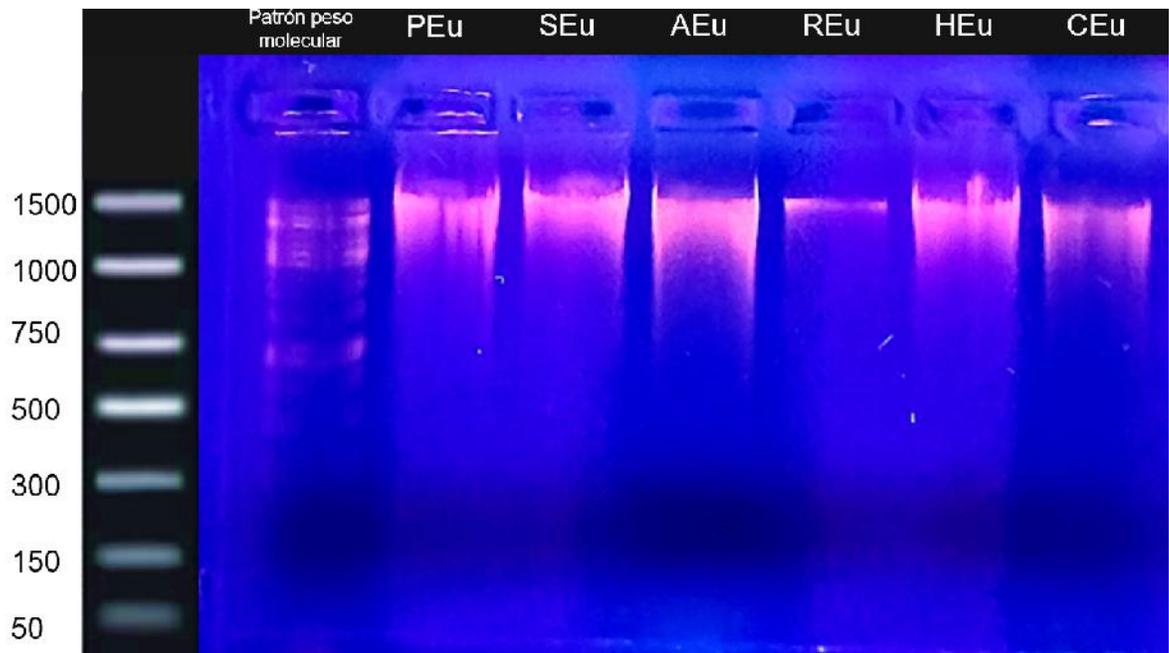


Figura 16. PCR= Producto de extracción de ADN de distintos aislados bacterianos, con marcador en 1,500 pb.

Tabla 10. Números de acceso de bacterias aisladas en plataforma GenBank

Bacteria aislada	Numero de acceso GenBank
Aislado PEu	PQ012656.1
Aislado REu	PQ012655.1
Aislado CEu	PQ012617.1
Aislado HEu	PQ012621.1
Aislado SEu	PQ012657.1
Aislado AEu	PQ012618.1

Como resultado de la secuenciación fue realizado un árbol filogenético con diferentes especies de *Bacillus* de entre ellos fueron aisladas en gran parte del continente asiático, Canadá, EUA y Países Bajos. La mayoría fue aislada de muestras de suelo, composta y rizósfera de plantas en específico, esto nos indica

que el género *Bacillus* es un organismo cosmopolita, cabe mencionar que al ser aisladas en diferentes años también muestra la persistencia de este tipo de bacterias a través del tiempo, dándonos como resultado la identificación taxonómica aproximada de los aislados evaluados.

La especie de *Bacillus halotolerans* (99% de similitud) es la más parecida a las bacterias denominadas PEu y REu que fueron aisladas en este trabajo de investigación, cabe mencionar que, aunque en algunas pruebas realizadas con ambas bacterias se comportan de manera similar como en la producción de ácido indol acético y la solubilización de fosfato; son morfológicamente diferentes y dentro de otros ensayos realizados también presentan disparidad. Cabe mencionar que la ramificación del dendograma pudieran tener un parecido a *B. subtilis* siendo una especie ampliamente utilizada incluso de manera comercial como promotor de crecimiento y bioprotector contra distintas enfermedades (Wen y col., 2020; Wu y col., 2022; Wang y col., 2023).

Para el caso de *Bacillus* CEu, no presenta una relación filogenética clara con alguna de las especies presentes en el árbol (Figura 16), aunque pudiera ser cercano a *Bacillus toyonensis* (98% de similitud), el estudio de esta especie ha sido enfocado al área de la salud también se ha demostrado su actividad antimicrobiana de bacterias fitopatógenas, que son beneficiosa para la agricultura, de igual manera *B.thuringiensis* (99% de similitud) existen diversos estudios evaluando su potencial contra distintas plagas de lepidópteros y coleópteros, por lo que también es una bacteria utilizada para el sector agrícola, por lo que en cualquier caso explicaría que dentro de las 21 bacterias evaluadas de manera antagónica CEu sobresaliera siendo una de las seis mejores (Lopes y col., 2017; Luo y col., 2021; Nascimento y col., 2022).

El género *Peribacillus* sp. (99% de similitud) formaba parte del género *Bacillus* contiene cepas bacterianas grampositivas, formadoras de esporas y facultativas, que han sido aislados de distintos nichos ecológicos como suelo, tejidos vegetales, heces humanas, entre otros. Dentro de algunas características destaca la promoción de crecimiento vegetal, biocontrol con respecto a enfermedades

vegetales y la biorremediación, de tal manera que la similitud a este género es concorde con lo obtenido en los resultados (Martinez-Absalon y col., 2012; Liang y col., 2023; Guo y col., 2025).

Centrándonos en las bacterias nombradas *Bacillus* SEu y HEu, al igual que el caso anterior, el segmento secuenciado es parecido a *B. cereus* (99% de similitud), esta es una bacteria ha sido probada contra distintos tipos de fitopatógenos que participan en distintas enfermedades para la producción de hortalizas como *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, por lo que las bacterias SEu, HEu o incluso CEu al estar relacionada con esta especie según el análisis filogenético realizado (Figura 17) explicaría su control contra dos de los hongos antes mencionados (*R. solani* y *F. oxysporum*).

Aunque este análisis solo confirma el género de la especie, recomienda la realización de un estudio más completo en cuanto a la identificación taxonómica para mencionar con exactitud las especies de bacterias aisladas en este trabajo (Moshe y col., 2023 y Xie, 2024). Cabe mencionar que tanto la especie de *Bacillus subtilis*, *B. cereus* al igual que *B. thurigiensis* han sido aisladas de la rizósfera de una especie *Kalanchoe blossfeldiana* perteneciente al mismo género de planta, de la cual se aislaron las bacterias mencionadas (Dalda y Ünlü, 2023).

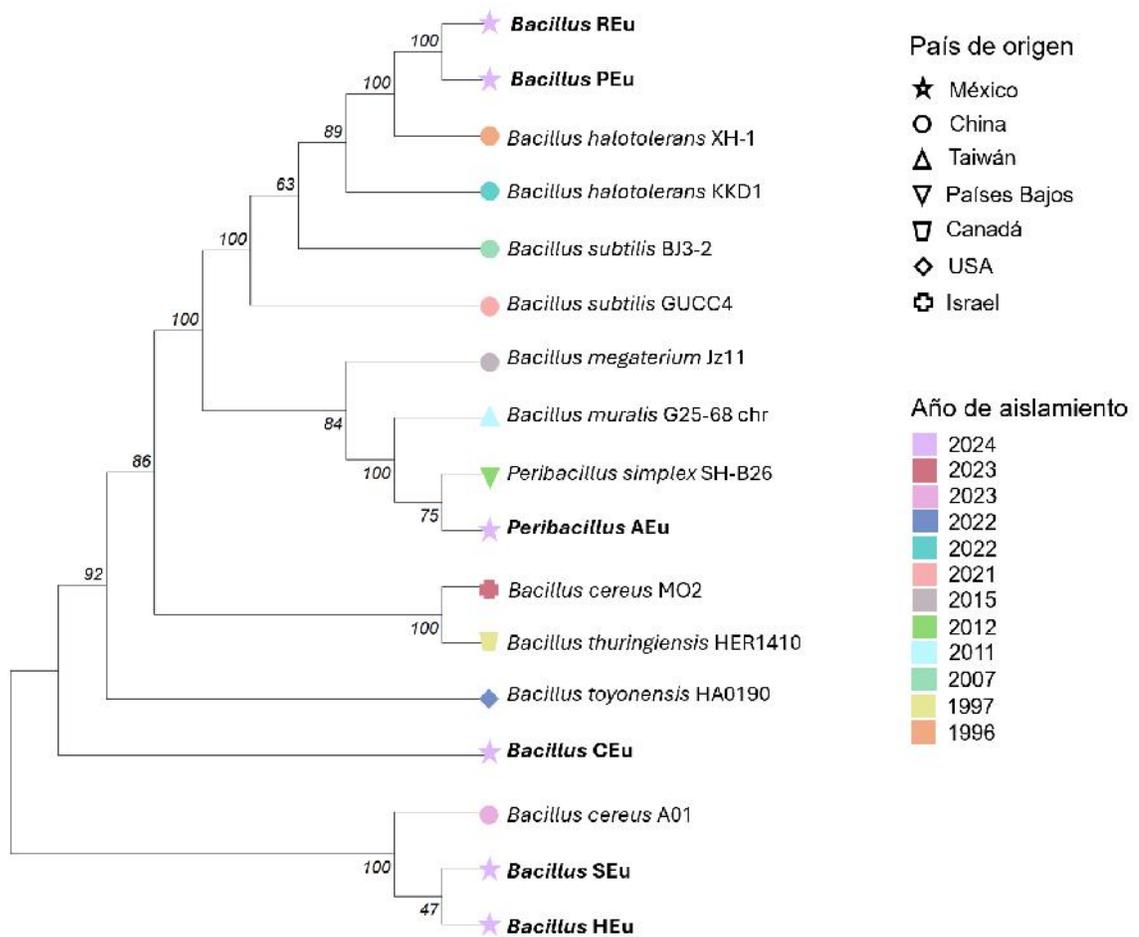


Figura 17. Análisis filogenético de las bacterias encontradas en la zona rizosféricas de *K. delagoensis*.

5.4 Promoción de crecimiento vegetal en plántula.

5.4.1 Pruebas Bioquímicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal.

El uso de PGPB en cultivares provoca un efecto favorable en el desarrollo en las plantas (Szilagyi-Zechin y col. 2022). Por tal motivo, el total de las 21 cepas aisladas fueron caracterizadas a través de varias propiedades relacionadas con la promoción

de crecimiento vegetal de manera cualitativa, en la búsqueda de otro tipo de beneficios que estas bacterias podrían darles a los cultivos de interés agrícola.

Comenzando con la producción de sideróforos, los aislados fueron sembrados en placas Petri con Medio Cromo Azurol S (CAS), se tomó como positivo el cambio de color a tonos anaranjados y la precipitación del sideróforo, observada después de un lavado de la placa. Solo presentaron la formación de este quelato las bacterias *Bacillus* CEu, HEu y SEu (Tabla 10, Figura 18).

Los sideróforos pueden estar relacionados con el antagonismo microbiano (Ranjan-Deb y Tatung, 2024); sin embargo, no dieron positivo los aislados *Bacillus* PEu, REu y AEu que en los ensayos de cultivo dual presentaron actividad antagónica, de tal manera que para las bacterias productoras de sideróforos se requeriría de la extracción del compuesto y su evaluación contra el fitopatógeno para conocer si la producción de este metabolito explica o favorece el antagonismo contra los distintos hongos fitopatógenos evaluados.

Por otra parte, para el ensayo de solubilización de fosfatos se utilizaron placas Petri con medio selectivo NBRIP- BPB y se consideró positivo con la formación de un halo amarillento que rodea el crecimiento de la bacteria. Nueve de los veintiún aislados pudieron solubilizar fósforo (Tabla 11, Figura 18) lo que corresponde al 43% de las bacterias cultivables analizadas, las bacterias que dieron un resultado positivo fueron: BEu, EEu, JEu, KEu, PEu, QEu, REu, TEu y UEu.

Se ha demostrado que del aislamiento rizosférico de bacterias existe un porcentaje de estas que pueden solubilizar fosfato, desde plantas de interés agrícola como el tomate (*S. lycopersicum*) en un 47% de los aislados (Guerrieri y col. 2020) hasta cactáceas en un 23% de los aislados (Luna-Martinez y col. 2013).

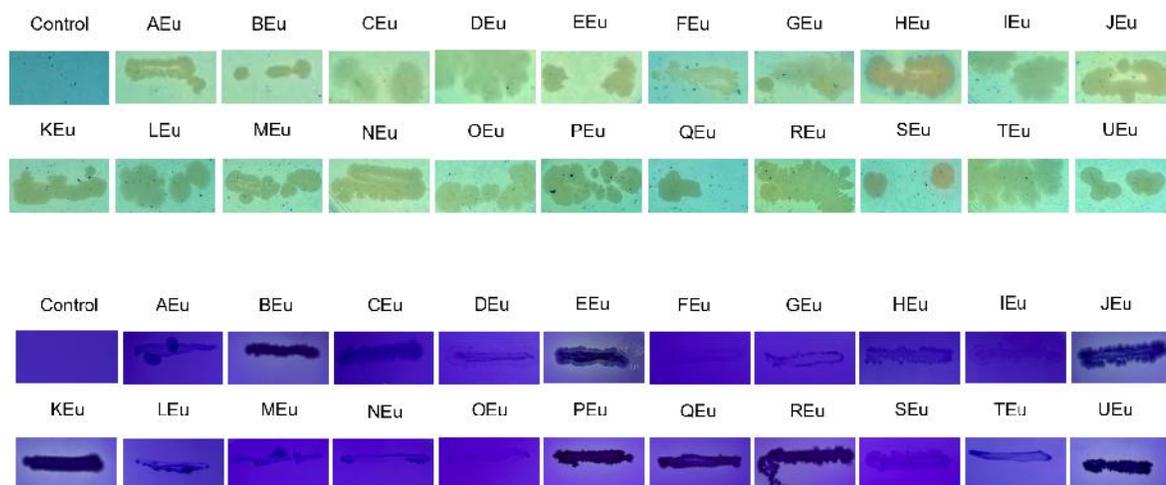


Figura 18. Placas de medios selectivos (a) Medio NBRIP-BPB para solubilización de fósforo. (b) Medio Chromo Azurol-S ((CAS) para la producción de sideroforos).

Todos los aislados produjeron ácido indolacético superior al control, y al realizar una prueba de Tukey existen diferencias entre los aislados bacterianos (Tabla 11). El nivel más alto de producción de ácido indolacético fue 27.79 mg L^{-1} producido por la bacteria MEu, mientras que el valor más bajo de producción fue de 8.61 mg L^{-1} por HEu. Para el caso de la fijación biológica de nitrógeno, solo AEu dio como resultado una prueba positiva debido a su crecimiento dentro de tubo en la parte microaerofílica.

Bacillus halotolerans que fue relacionada con el aislado PEu en el análisis filogenético, tuvo mejores inhibiciones contra los distintos fitopatógenos a evaluar, esta especie ha reportado actividad en la solubilización de distintos minerales como zinc, potasio y fósforo, producción de ácido indolacético (Poria y col., 2024) concordando con las propiedades que *Bacillus* PEu demostró durante estos ensayos.

Tabla 11. Características bioquímicas de los aislados bacterianos de la rizósfera de *Kalanchoe delagoensis*.

Aislado	Solubilización de Fósforo	Producción de Sideróforos	Producción de ACC	Producción de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fijación biológica de nitrógeno
PEu	+	-	-	12.71 cde*	-
REu	+	-	-	10.07 de	-
CEu	-	+	-	10.28 de	-
HEu	-	+	-	8.96 de	-
SEu	-	+	+	15.73 bcd	-
AEu	-	-	-	18.34 bc	+
OEu	-	-	-	8.61 de	-
MEu	-	-	-	9.46 de	-
LEu	-	-	-	13.06 cde	-
DEu	-	-	-	19.03 bc	-
BEu	+	-	+	15.03 bcde	-
NEu	-	-	-	27.79 a	-
GEu	-	-	+	21.81 ab	-
QEu	+	-	-	14.82 cde	-
TEu	+	-	-	10.31 de	-
UEu	+	-	-	11.50 de	-
EEu	+	-	+	11.23 de	-
FEu	-	-	-	9.62 de	-
IEu	-	-	-	13.50 cde	-
JEu	+	-	+	10.89 de	-
KEu	+	-	+	19.03 bc	-

*Las medias que no comparten literal son significativamente diferentes.

5.4.2 Promoción de crecimiento vegetal en plántula.

Con las seis bacterias que mostraron capacidad antagónica a los fitopatógenos causantes del damping-off se procedió a realizar una evaluación *in vivo* de germinación y promoción de crecimiento vegetal a través de la inoculación de semillas.

Al evaluar las plántulas de tomate (*S. lycopersicum*), de manera general el *Bacillus* P_{Eu} tuvo un mejor desempeño en cuanto a la mayoría de las variables evaluadas, según las pruebas de Tukey realizadas las variables de diámetro del tallo, altura y la biomasa del vástago, tanto fresca como posterior a su secado, aumentando de un 125 %, 142 %, 125 % y 146 % respecto al control (Tabla 12).

Cabe mencionar que el porcentaje de germinación vario de poco más del 60% hasta 91%, él control obtuvo un valor de 80 % y el control positivo de 78%, pese a que la bacteria P_{Eu} tuviera un porcentaje de germinación del 91%, superior a ambos controles, mientras que la variabilidad de los demás tratamientos muestra que el concentrado bacteriano no tuvo influencia en el aumento de esta variable, pudo tener un efecto inhibitorio; sin embargo, para esta afirmación se requerían más estudios.

En un estudio de Luna-Martínez realizado en el 2013 se aumentó en un 90 % el diámetro del tallo (DT) de plántulas de tomate inoculadas con *Bacillus*, en la investigación realizada el porcentaje con mayor aumento lo realizó el aislado P_{EU} con un aumento del 79% con respecto al control.

En cuanto a la relación de la biomasa total, el rango fue de entre 1.27 y 4.05 gramos promedio. P_{Eu} obtuvo el mayor peso total de las plántulas evaluadas y el mayor peso del vástago; aunque, si se realiza la comparación con respecto a la biomasa del sistema radicular, existieron tratamientos con mayor peso, indicando que la inoculación del aislado *Bacillus* P_{Eu}, favoreció el desarrollo a la parte aérea de las plantas más que su raíz. Para el análisis de Tukey de la biomasa seca del

sistema radicular y el vástago, son consistentes con lo obtenido en los resultados previos al secado.

Tabla 12. Evaluación de promoción de crecimiento vegetal de los diferentes aislados en plántulas de tomate (*S. lycopersicum*) a condiciones de invernadero.

Aislado	Diámetro							
	de tallo	Altura	% G	Peso total BV		BVS	BSR	BSRS
PEu	3.46 a	14.86 a	91.67 a	4.05 a	2.91 a	0.51 a	0.99 a	0.06 a
REu	2.65 cd	9.23 cd	61.67 bc	1.82 c	1.28 c	0.25 cd	0.46 b	0.03 b
CEu	2.59 de	8.46 d	61.67 bc	1.68 c	1.09 cd	0.23 d	0.49 b	0.03 b
HEu	2.60 cde	9.82 cd	70.00 ab	1.80 c	1.29 c	0.21 d	0.43 b	0.02 b
SEu	3.05 b	12.25 b	86.67 a	3.74 ab	2.59 ab	0.38 b	1.04 a	0.05 a
AEu	2.25 e	6.22 e	38.33 c	1.27 c	0.78 d	0.17 d	0.37 b	0.02 b
MA06	2.95 bc	10.26 cd	78.33 ab	3.44 b	2.22 b	0.35 bc	1.14 a	0.05 a
Control	2.76 bcd	10.48 bc	80.00 ab	3.50 ab	2.34 b	0.35 bc	1.08 a	0.05a
DMS_{0.05}	0.37	1.81	24.00	0.58	0.46	0.11	0.23	0.02
CV (%)	5.70	7.60	14.43	9.39	10.76	15.12	13.20	17.87

% G= Porcentaje de germinación; BV= Biomasa vástago; BVS= Biomasa vástago seca; BSR= Biomasa sistema radical; BSRS= Biomasa sistema radical seca; DMS_{0.05} =diferencia mínima significativa (Tukey, 005); CV=coeficiente de variación; *Medias (n=40) con letras iguales en cada columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 005).

De manera adicional fue realizado un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), aunando en la relación que pudieran tener las propiedades bioquímicas de crecimiento vegetal, así como la inhibición (Anexo 1). Sin embargo, no existe relaciones de tendencia entre las propiedades bioquímicas debido a que algunas son medidas *in vitro* y otras *in vivo*, mientras que la inhibición de igual forma no se relaciona con ninguna de las variables evaluadas.

5.4 Ensayos de biocontrol de “damping- off” en germinados de semillas de tomate (*S. lycopersicum*).

Esta prueba fue realizada mediante una matriz de severidad de manera cualitativa expresada en porcentajes. Al realizar el ensayo de biocontrol de *Fusarium* sp. se utilizó solo *Bacillus* PEu debido a sus buenos resultados en ensayos de inhibición *in vitro* contra los diferentes fitopatógenos y su comportamiento en la promoción de crecimiento *in vivo*.

Para el nivel de severidad tres de daño fue considerado recuperable, a diferencia del nivel cinco, esto debido a que, para este último, el germinado está totalmente cubierto de micelio y la radícula presenta una podredumbre completa. Las semillas evaluadas como control negativo se encontraban entre los niveles cuatro o cinco de daño y solo el 8% de los germinados estaba totalmente sana (Figura 19 y 20).

Al evaluar el biocontrol de *B. subtilis* Q11 podemos observar que el porcentaje en los germinados sanos sube un 2% y disminuye un 16% en los germinados cuyo valor de severidad es cinco (Figura 19). De manera descriptiva, en las unidades experimentales la inhibición de crecimiento del hongo es notoria debido a la formación de huecos donde la bacteria consolidó su crecimiento (Figura 19).

Para el caso de *Bacillus* PEu, supera a lo observado por el control positivo, con una reducción respecto al control de semillas muertas en un 22%, por lo que podemos decir que aumento 12 % de biocontrol total de la infección creada por el fitopatógeno y de igual manera, aumentó el número de semillas que no presentaron ningún tipo de daño en un 14% respecto al control negativo. Cabe mencionar que para este tratamiento el 60% de las semillas son viables un 14% más que lo obtenido con Q11 (Figura 19).

En el tratamiento de con *Bacillus* PEu es más evidente en la unidad experimental la inhibición del crecimiento radial, al no permitir el crecimiento de

Fusarium sp. a diferencia de lo ocurrido con *B. subtilis* Q11, los germinados son visiblemente presentan menos cobertura de micelio, más sanos, largos y desarrollados. De entre los valores de daño, algunos de los germinados ya presentaban la apertura de cotiledones (Figura 19).

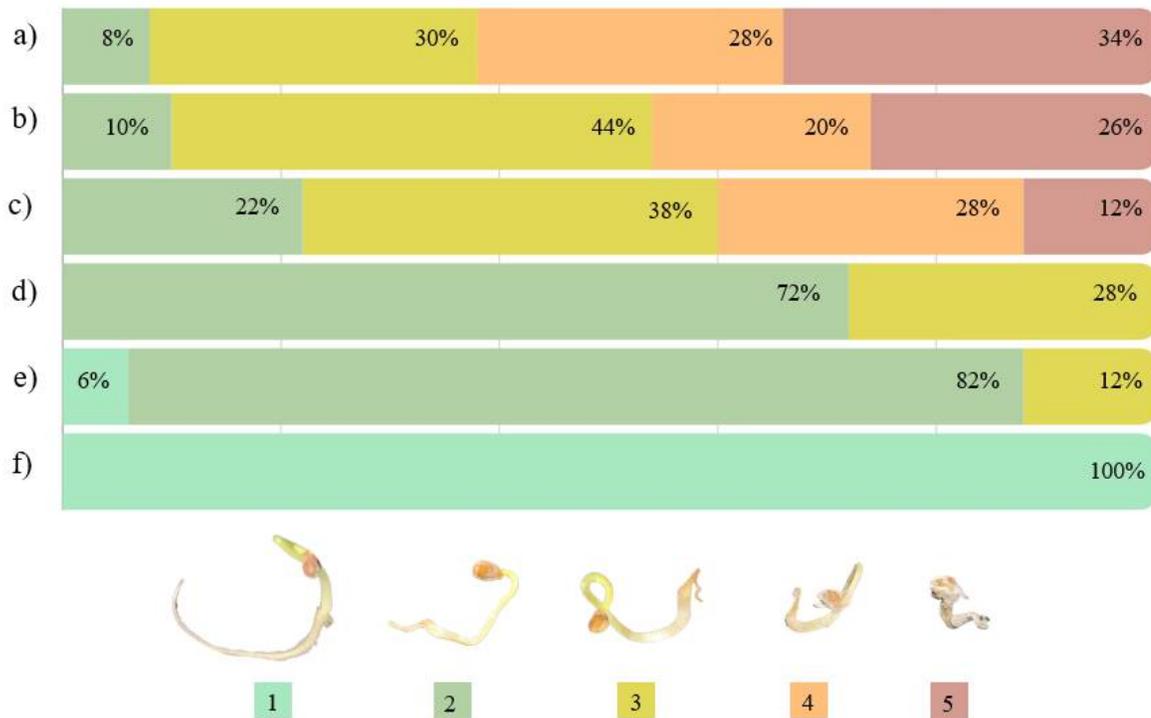


Figura 19. Biocontrol del daño causado por *Fusarium* sp en semillas de tomate daño (n= 50 germinados). (a) Control de *Fusarium* sp. (b) Biocontrol *B. subtilis* Q11. (c) Biocontrol *Bacillus* PEu. (d) *B. subtilis* Q11 en semilla. (e) *Bacillus* PEu en semilla. (f) Control de semilla.

De igual forma, para las interacciones entre las dos bacterias utilizadas y las semillas germinadas, podemos observar que todas se encuentran en un rango óptimo respecto a la viabilidad (Figura 20). En las interacciones con bacterias, en ambos casos, comparadas con el control negativo, presentan lesiones leves o mínimas comprensibles debido a que al ser una interacción *in vitro* (Figura 20).

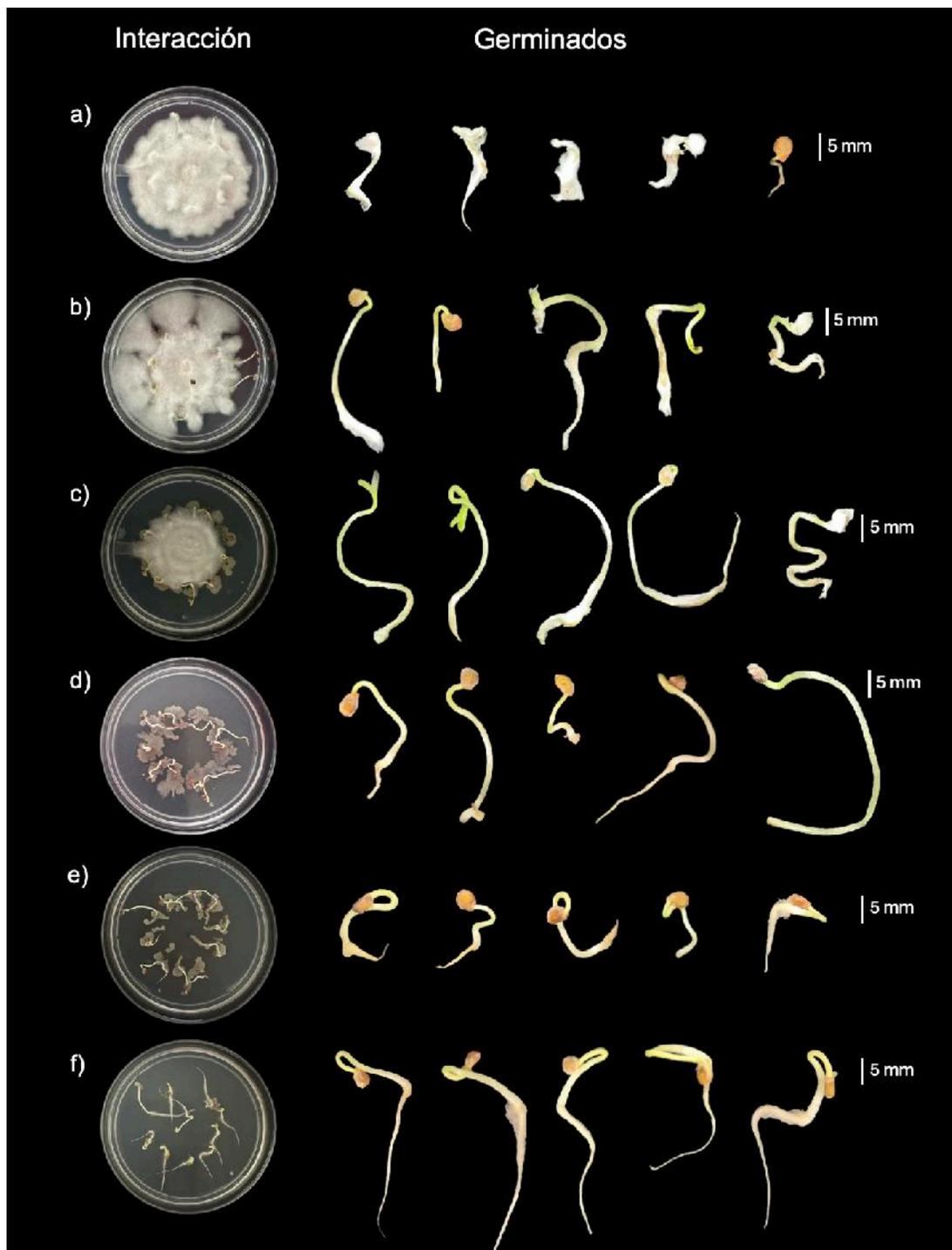


Figura 20. Biocontrol en germinados de semilla de Q11 y el aislado PEu. (a) Control de *Fusarium* sp. (b) Biocontrol *B. subtilis* Q11. (c) Biocontrol *Bacillus* PEu. (d) *B. subtilis* Q11 en semilla. (e) *Bacillus* PEu en semilla. (f) Control de semilla.

De entre todos los tratamientos evaluados *Bacillus* P_{Eu} fue el que obtuvo mejores valores de biocontrol, esto se puede deber a sus propiedades de promoción de crecimiento probadas con anterioridad tanto *in vitro* e *in vivo*. *Bacillus halotolerans* ha sido estudiada debido a la producción de diversos compuestos bioactivos o metabolitos secundarios con propiedades para combatir microorganismos patógenos (Soni y col., 2014; Poria y col., 2024). De manera más específica, se ha identificado que *B. halotolerans* produce 2,3-hexanodiona que inhibe la germinación *F. oxysporum* (Rana y col. 2024). Tales atributos concuerdan con lo observado en el ensayo realizado.

VI. Conclusiones.

En la bioprospección de nuevas fuentes de aislamiento de *Bacillus*, la rizosféra de *K. delagoensis* posee poblaciones microbianas del género en cuestión comparables con cultivos ornamentales o agrícolas, encontrando especies como *B. halotolerans*, *cereus* y *peribacillus simplex*.

A nivel *in vitro*, los aislados de *Bacillus* presentaron propiedades bioquímicas relacionadas con la promoción de crecimiento vegetal, así como, inhibición hacia distintos fitopatógenos de interés agrícola.

Para los ensayos *in vivo* sobre semillas, *Bacillus* PEu mostro una reducción en la incidencia y el daño ocasionado por *Fusarium* sp. Además de exhibir propiedades de promoción de crecimiento en la planta, mejorando la altura, el diámetro del tallo y la biomasa del vástago.

Se requieren más investigaciones para conocer las interacciones entre *Bacillus* PEu y el fitopatógeno, para así desarrollar tecnologías de aplicación para su uso como agente de biocontrol, así como la producción *in vivo* de cada una de las pruebas bioquímicas realizadas.

VII. Referencias.

Abdul-Saleem, S., Duggempudi-Vijaya, L., Garnepudi, B. Shaik, N., Valaparla, N., Yerribonia, A., Suresh, K. (2022). Evaluation of antimicrobial activity of ethanolic extract of *Kalanchoe gastonis bonnierii* and *Kalanchoe delagoensis*. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications* 7 (3): 2069-2076.

Adeniji, A. A., Aremu, O. S., Loots, D. T., Babalola, O.O. (2020). *Pseudomonas fulva* HARBPS9.9: candidate anti- *Fusarium* agent in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 157: 767- 781, <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02035-4>

Aguado-Martínez, A., Fernández-Cavada, S., Cambra-Álvarez, M., Escriu-Paradell, F., y Artiaga, M. (2023). *El Virus del Mosaico del Tomate*, Gobierno de Aragon https://www.aragon.es/documents/20127/674325/ToMv_1_1.pdf/2c118a13-3cdd-3855-5fde-41294bf8e194. Consultado 02/05/2023.

Aguado-Santacruz, G. A., Moreno- Gómez B., Jiménez-Francisco B., García-Moya Edmundo y Preciado-Ortiz Ricardo E. (2012). Impact of microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35 (1); 9 - 12.

Aguilar, A., Twardowski, T., y Wohlgemuth , R. (2019). Bioeconomy for sustainable development. *Biotechnology Journal* 14 (8): 1800638, <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201800638>.

Aguilar- Diaz, T., Bertolini, V., Carillo- Castañeda, G., Guillén- Navarro, G., García-Fajardo, L., V., Castro- Chan, R., A. (2018). Rizobacterias promotoras de crecimiento en *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). *Revista de Biología Tropical* 66 (3): 953- 968.

Alves, A., Yin, Q., Oliveira, R., Silva, E., y B. Novo, L. (2022). Plant growth-promoting bacteria in phytoremediation of metal-polluted soils: Current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment* 838 (4): 156435, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156435>.

Al-Zomor, R., Khlaif, H., y Akash, M. (2013). Detection and Identification of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica (Van Hall, 1902) the causal agent of potato blackleg by RFLP-PCR. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 9 (2): 170-183, <https://doi.org/10.12816/0001100>.

Amaria, W., Suradji- Sinaga, M., Hamzah- Mutaqin, K., Supriadil y Widodo (2023) Hamolysis and hypersensitive tests ease culture collection management of antagonistic bacteria. *Journal of tropical plant pests and diseases* DOI: <https://doi.org/10.23960/jhptt.22324-30>

Arshad-Ali, M., Ahmed, T., Ibrahim, E., Rizwan, M., Chong, K. P., Hong-Yong, J. W. (2024). A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria in biocontrol of plant pathogenic fungi and their plant growth-promoting activities. *Heliyon* 10 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31573>

Akram, W., Anjum, T., y Ali, B. (2015). Co-cultivation of tomato with two *Bacillus* strains: effect on growth and yield. *Journal of Animal and Plant Sciences* 25 (6): 1644- 1651.

Alexander, D., Y Zuberer, D. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12: 39-45.

Alves-Ribeiro, I., Bach, E., Silva-Moreira, F., Müller a, A., Rangel a, C., Morschboácher-Wilhelm, C., Barth, P., Pereira-Passaglia, L. (2021). Antifungal potential against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary and plant growth promoting abilities of *Bacillus* isolates from canola (*Brassica napus* L.) roots. *Microbiological Research* (248): 126754, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126754>.

Asiedu- Gyekye, I., Antwi, D., Awortwe, C., N'guessan, B., y Nyarko, A. (2013). Short-term administration of anaqueous extract of kalanchoe integra var.crenata (Andr.) Cufleaves produces no major organ damagein Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151 (2): 891- 896, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.050>.

Azeem, S., Agha, S., Jamil, N., Tabassum, B., Ahmed, S., Raheem, A., Jahan, N., Ali, N., Khan, A. (2022). Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología* 54 (3): 233- 242, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.10.005>.

Azzam, C., Abd El-Naby, Z., Abd El-Rahman, S., Omar, S., Ali, E., Majrashi, A., y Rady, M. (2022). Association of saponin concentration, molecular markers, and biochemical factors with enhancing resistance to alfalfa seedling damping-off. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29 (4): 2148- 2162, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.046>.

BASF. (2023). *Esclerotinia de la lechuga* . Obtenido de <https://www.agro.basf.es/es/Servicios/Gu%C3%ADa-de-plagas/Enfermedades-f%C3%BAngicas/Enfermedad-Tallo/Esclerotinia-de-la-lechuga/>. Consultado 10/04/2023.

Bhattarai, A., Sharma, A., Yadav, R. K., y Wagle, P. (2020). Interacting effects of botanicals, biocontrol agents, and potting media on *Rhizoctonia solani* led damping-off of okra seedlings. *Journal of Agriculture and Food Research* 10: 100410, <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100410>.

Bojacá-Aldana, C., Casilimas, H., Monsalve, O., Gil-Castañeda, R., y Villagran-Munar, E. (2023). *Manual de Producción de Pepino Bajo Invernadero*. https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/wysiwyg/pub_54_manual_de_produccion_de_pepino.pdf. Consultado 02/02/2023.

Buxton, R. (2016). Blood agar plates and hemolysis protocols. American society for microbiology. <https://asm.org/getattachment/7ec0de2b-bb16-4f6e-ba07-2aea25a43e76/protocol-28>

Caamal-Velázquez, J. H., Arjona-Sabido, R., Caamal-Velázquez, J., Rodríguez-Ávila, N., Solís-Pereira, S., y Lizama-Uc, G. (2018). Inhibición del crecimiento y modificación genética de *Phytophthora capsici* usando quitosano de bajo grado de

polimerización. *Revista Argentina de Microbiología* 51 (1):12- 17, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.03.003>.

CABI. (2022) *Kalanchoe delagoensis*. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/115050>. Consultado 23/09/2022.

Calvo, P. y Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aislados de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1): 31-39.

Cedillo-Portugal, E., Martínez-Hernández, L., Casiano-Herrera, H., Hernández-Alvarado, D., Padilla-Martínez, C., y Rodríguez-Terán, M. (2023). <https://planificacionfesaragon.com/sites/default/files/manuales/Manual%20de%20Produccion%20de%20Lechugas%20Bajo%20Invernadero.pdf>. Consultado 10/01/2023.

CEDRSSA. (2023). *Análisis de la producción y consumo de hortalizas*. http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-annolisis_-n-_de_la__-n-produccinin_-n_y__-n-consumo_-n-_de__-n-hortalizas_-n.htm. Consultado 16/02/2023.

Centurión-Belotto, S., Aquino-Jara, A., y Bozzano-Sagui, G. (2013). Extractos vegetales para el control alternativo del damping-off causado por *Rhizoctonia solani* en plántulas de tomate. *Investigación agraria* 15 (1): 23- 29.

Chaplygina, A. (2023) Almy Stooch Semilla calabaza (*Cucurbita moschata* Duchesne). <https://www.alamy.es/las-semillas-se-germinaron-en-una-calabaza-podrida-de-enfoque-suave-image355067475.html>. Consultado 10/04/2023.

Chávez-Ambriz, L. A., Hernández-Morales, A., Cabrera-Luna, J. A., y Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y floración en *Mammillaria* spp. *Revista Argentina de Microbiología* 48 (4): 333- 341, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.001>.

Chávez-Castillo, M., Livia-Córdova, Muñoz-Ganoza, E., Otiniano-García, M., Luján-Velásquez, M., y Castro-Sarabia, J. (2006). Comparative evaluation of sheep

blood agar and human blood agar in the isolation of beta hemolytic *Streptococcus* of patients with pharyngitis from Almanzor Aguinaga Asenjo hospital of Chiclayo, Perú. *Revista Medica Vallejana* 4 (2):148- 154.

Chávez, A., y Aquino-Jara, A. (2012). Control of soil fungi *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Sclerotium* sp. with plant ex. *Investigación agraria* 14 (1): 17- 23.

Chen, B.-M., Li, S., Liao, H.-X., y Peng, S. L. (2017). Do forest soil microbes have the potential to resist plant invasion? A case study in Dinghushan Biosphere Reserve (South China). *Acta Oecologica*, 81: 1–9. doi:10.1016/j.actao.2017.04.003.

Coromoto-Alcedo, Y., y Reyes, I. (2018). Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de *Alternaria alternata* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Bioagrp* 30 (1): 59- 66.

Correa, A., Quiroz E., C., Sepúlveda R., P., Salas F., C., Moyano A., S., Elgueta P., S., y Astudillo O., C. (2023). Fortalecimiento de la inocuidad en hortalizas de hoja, <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/6595/Bolet%C3%ADn%20I NIA%20N%C2%B0%20348?sequence=1&isAllowed=y>. Consultado 10/03/2023.

Cremona, M. V., y Enriquez, A. S. (2020). *Algunas propiedades del suelo que condicionan su comportamiento: El pH y la conductividad eléctrica*. EEA Bariloche.

Dalda, A. Ş., Ünlü, E. (2023). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Applications on Rooting and Seedling Quality of Cuttings *Kalanchoe* (*Kalanchoe blossfeldiana*). *Journal of Erciyes Agriculture and Animal Science*, 6(1):73-78.

Daouti, E., Feit, B., y Jonsson, M. (2022). Agricultural management intensity determines the strength of weed seed predation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 339: 108132, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108132>.

Delhey, R., Kiehr, M., García-Lorenzana, U., Bellacomo, C., Caracotche, V., Frayssinet, S., Zazzetta, M., Sosa, C., Kroneberger, E. (2023). *Podredumbres*

Bacterianas de Cebolla en Argentina. <http://aafitopatologos.com.ar/wp/wp-content/uploads/2019/06/Boletin-N3-AAF-Junio-2019.pdf>. Consultado 21/03/ 2023.

Descoings, B. (2003) *Kalanchoe*, Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae. Springer Science & Business Media 6: 143-181.

Descoings, B. (2006). Le genere *Kalanchoe* structure et définition par Bernard Descoings. *Le J. Bot.* 33: 3-28.

Dick, M.W., Wong, P.T.W. & Clark, G. (1984). The identity of the oomycete causing kikuyu yellows with a reclassification of the downy mildews. *Botanical Journal of the Linnean Society* 89: 171-198.

Duhan, P., Bansal, P. y Rani, S. (2020). Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria from medicinal plant *Tinospora cardifolia*. *South African Journal of Botany*: 1- 7, <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2020.01.047>.

Durán-Barradas, Z. (2023). *La marchitez de los cultivos causada por los hongos Fusarium*. Obtenido de <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1705-la-marchitez-de-los-cultivos-causada-por-los-hongos-fusariuAm>. Consultado 01/04/2023.

Dworkin, M., y Foster, J. (1958). Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. *Journal of Bacteriology* 75 (5): 592- 603, <https://doi.org/10.1128/jb.75.5.592-603.1958>.

El-Deeb, B., Fayez, K. y Gherbawy, Y., (2013). Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal of Plant Interactions* 8 (1): 56- 64.

EPPO. *Fusarium Oxysporum* (2023). <https://gd.eppo.int/taxon/1FUSAG>. Consultado 05/03/2023.

EPPO. *Alternaria alternata* (2023). <https://gd.eppo.int/taxon/ALTEAL/photos>. Consultado 05/03/2023.

EPPO. *Kalanchoe delagoensis* (2023). <https://gd.eppo.int/taxon/KANTU>. Consultado 15/03/2013

EPPO. *Rhizoctonia solani* (2023). <https://gd.eppo.int/taxon/RHIZSO>. Consultado 05/03/2023.

FAO. (2023a). *Recomendaciones para el manejo de maleza*. <https://www.fao.org/3/a0884s/a0884s.pdf>. Consultado 02/02/2023.

FAO. (2023b). *Produccion de hortalizas*. <https://iniciativasolidaria.itesa.edu.mx/resources/DCV/2.%20Que%20se%20puede%20cultivar.pdf>. Consultado 13/04/2023.

FAO. (2020). *State of knowledge of soil biodiversity*. <https://www.fao.org/3/cb1928en/cb1928en.pdf>. Consultado 01/03/2023.

FAO. (2023d). *World Food and Agriculture*. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc2211en>. Consultado 04/02/2023.

Félix-Gastélum, R., Maldonado-Mendoza, I. E., Beltran-Peña, H., Apodaca-Sánchez, M., Espinoza-Matías, S., Martínez-Valenzuela, M., . . . Olivas-Peraza, N. (2017). Powdery mildews in agricultural crops of Sinaloa: Current status on their identification and future research lines. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35 (1): 106- 129, <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1607-4>.

Fertilab. (2023). *Síntomas de Damping-off en tomate*. Obtenido de fertilab.com.mx/Sitio/notas/NTF-19-007-Sintomas-de-Damping-off-en-tomate.pdf. Consultado 01/04/2023.

Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., y Lemanceau, P. (2003). Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. *Agronomie* 23: 407- 418, https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_37.

García-De Salamone, I. (2022). Microbiología, bioeconomía y objetivos de desarrollo sostenible. *Revista Argentina de Microbiología*, 54: 71- 73 <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.007>.

Gavito, M., Van-der Wal, H., Aldasorob, E., Ayala-Orozco, B., Bullén, A., Cach-Pérez, M., Casas-Fernández, A., Fuentes, A., González-Esquivel, C., Jaramillo-López, P., Martínez, P., Masera-Cerruti, O., Pascual, F., Pérez-Salicrup, D. R., Robles, R., Ruiz-Mercado, I., Villanueva, G. (2017). Ecology, technology and innovation towards sustainability: challenges and perspectives in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 88, 150- 160, <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.09.001>.

Godwin, R. A. Mchau y Coffey, M. D. (1995). Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species, *Mycological Research* 99 (1): 89-102, [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80321-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80321-3).

Golubov-Figueroa, J. (2023). *Especies ornamentales invasoras en el caso de Kalanchoe delagoensis*. https://enciclovida.mx/pdfs/exoticas_invasoras/Kalanchoe%20delagoensis.pdf. Consultado 24/04/2023.

González-Morejón, N., Martínez-Coca, B., y Infante-Martínez, D. (2010). Mildiu polvoriento en las cucurbitáceas. *Protección Vegetal* 25 (1): 44- 50.

Guerrero-Prieto, V., Blanco-Pérez, A., Guigón-López, C., Tamayo-Urbina, C., Molina-Corral, F., Berlanga-Reyes, D., Carvajal-Millán, E., Y Ávila-Quezada, G. (2011). Competencia por Nutrientes; Modo de Acción de Candida oleophila Contra Penicillium expansum y Botrytis cinerea. *Revista mexicana de fitopatología*, 29(2): 90-97. Recuperado en 12 de junio de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200001&lng=es&tlng=es.

Guerrieri, M.C., Fanfoni, E., Fiorini, A., Trevisan, M., Puglisi, E. (2020). Isolation and Screening of Extracellular PGPR from the Rhizosphere of Tomato Plants after Long-

Term Reduced Tillage and Cover Crops. *Plants*. Basel 9(5):668. doi: 10.3390/plants9050668. PMID: 32466288; PMCID: PMC7285081.

Guo, Y., Zhan, J., Yan, Y., Wu, Y., Zhu, N. y Deng, C. (2015). Molecular Phylogenetic Diversity and Spatial Distribution of Bacterial Communities in Cooling Stage during Swine Manure Composting. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 28 (6), <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0882>.

Hashem, A., Tabassum, B., y Abd-Allah, E. (2023). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26 (6): 1291- 1297, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>. Consultado 04/05/2023.

Hu, Q., y Xu, J. (2011). A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(25): 4321-4327, <https://doi.org/10.5897/AJMR11.238>.

Jiménez-Pérez, O., Gallegos-Morales, G., Hernández-Castillo , F., Espinoza-Ahumada, C., Castro-Del Angel , E., y Sanchez-Yañez, J. (2023). Actividad Antagónica de *Pseudomonas donghuensis* y *Bacillus subtilis* para el manejo de fitopatógenos del “Damping off” del cultivo del chile. *Revista Bio Ciencias* 10, <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1382>.

Jindaluang, W., Kheoruenromne, I., Suddhiprakarn, A., Pal-Singh, B., Singh, B. (2013). Influence of soil texture and mineralogy on organic matter content and composition in physically separated fractions soils of Thailand, *Geoderma* 195: 207-219, <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.12.003>.

Johnson, M., y Nischwitz, C. (2023). *Damping-off* . <https://extension.usu.edu/pests/research/damping-off>. Consultado 04/02/2023.

Juárez, N. H. (2022). *Reconfiguración agroecológica "Teoría y redes de actores en la agricultura alternativa de Jalisco"*. Primera edición, Nuevo León, México: Itaca.

Khanna, K., Kohli, S. K., Ohri, P., y Bhardwaj, R. (2021). Plants-nematodes-microbes crosstalk within soil: A trade-off among friends or foes. *Microbiological Research* 248: 126755, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126755>.

Kumar, P., Dubey, R., & Maheshwari, D. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research* 167 (8): 493-499, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>.

Kouki, H., Ismail, A., Souihi, M., Pieracci, Y., Trabelsi, I., Hamrouni, L., Flamini, G., Hirsch, A. M., Mabrouk, Y (2023). Chemical composition, antioxidant, herbicidal and antifungal activities of leaf essential oils from three Tunisian Eucalyptus species. *Journal of Plant Diseases and Protection*. <https://doi.org/10.1007/s41348-023-00772-2>

Laemmlen, F. (2002). Damping-Off Diseases. *UC Agriculture & Natural Resources*: 8041, <https://doi.org/10.3733/ucanr.8041>.

Lamichhane, J., Dürr, C., Schwanck, A., Robin, M., Sarthou, J., Cellier, V., . . . Aubertot, J. (2017). Integrated management of damping-off diseases. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 37 (10), <https://doi.org/10.1007/s13593-017-0417-y>.

Lara, C., Esquivel Avila, L. M., y Negrete Peñata, J. L. (2011). Bacterias nativas solubilizadoras de fosfatos para incrementar los cultivos en el departamento de Córdoba- Colombia. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 9 (2): 114- 120.

Leslie, J., y Summerell , B. (2023). *The Fusarium Laboratory Manual*. https://www.researchgate.net/profile/Akhmad-Faisal-Malik/post/Does_the_colour_of_Fusarium_oxysporum_grown_on_PDA_differ_in_pathogenicity/attachment/59d6358979197b8077993194/AS%3A384846854672384%401468766048129/download/THE+FUSARIUM+LABORATORY+MANUAL.pdf. Consultado 10/03/2023.

Ley-López, N., Basilio-Heredia, j., Martín-Hernández, J. Ibarra-Rodríguez, R., Angulo-Escalante, M., García-Estrada, R. (2022). Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. *Revista Argentina de Microbiología* 54 (3): 181-191, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.03.002>.

Leyva-Mir, S., Vega-Portillo, H., Villaseñor-Mir, H., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., y Tovar-Pedraza, J. (2017). Caracterización de especies de *Fusarium* causantes de pudrición de raíz en el trigo en el Bajío, México. *Chilean journal of agricultural & animal sciences* 33(2): 142- 151, <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902017005000404>.

Liang, X., Gan, I., He, T., Chen, M., Zhang, M., Wu, Q. (2023). The coexisted nitrate and nitrite as a driving force for the aerobic denitrification of *Peribacillus* sp. EM-C3. *Environmental Technology & Innovation* 32, <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103299>.

Liu, Z., Khan, M. M., Fajar, A., Chen, S., Guo, M., Chen, Y., . . . Pan, H. (2021). Toxicity of fluralaner against vegetable pests and its sublethal impact on a biocontrol predatory ladybeetle . *Ecotoxicology and Environmental Safety* 225, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112743>.

Llewellyn C. Foxcroft, Steward T.A. Pickett, Mary L. Cadenasso (2011). Expanding the conceptual frameworks of plant invasion ecology, *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13 (2) :89-100, <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.03.004>.

Lockwood, J.L., Cassey, P. y Blackburn, T.M., (2009). The more you introduce the more you get: the role of colonization pressure and propagule pressure in invasion ecology. *Diversity Distributions* 15: 904–910.

Logan, N. A. y Halket, G. (2011) Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. *Soil Biology* 27 DOI: 10.1007/978-3-642-19577-8_1

Lopes, R., Cerdeira, L., Tavares, G. S., Ruiz, J. C., Blom, J., Horácio, E. C. A., Mantovani, H. C. y de Queiroz, M. V. (2017). Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World Journal Microbiological Biotechnology* 33 (185) doi: 10.1007/s11274-017-2347-x

Lou, G., Ling, N., Nannipieri, P., Chen, H., Raza, W., Wang, M., Guo, S., Shen, Q. (2017). Long-term fertilisation regimes affect the composition of the alkaline phosphomonoesterase encoding microbial community of a vertisol and its derivative soil fractions. *Biology and Fertility of Soils* volume 53: 375- 388.

Lucena, C., Sevillano, J., Alcalá, M., Aparicio, M.A., Ruíz, F.J., García, M.J., Prieto, P., Angulo, M., Pérez, R., Alcántara, E., Ramos, J., Romera, F.J. (2022). Efecto de una cepa de *Fusarium oxysporum* y de diversas levaduras sobre la nutrición férrica de plantas de pepino y tomate. *Sociedad Española de Ciencias Hortícolas* 86: 164-167.

Luna-Martínez, L., Martínez Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Medrano, S. M., & Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 63-69. Recuperado en 09 de julio de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100007&lng=es&tlng=es.

Luo, J.C., Long, H., Zhang, J., Zhao, Y. y Sun, L. (2021) Characterization of a Deep Sea *Bacillus toyonensis* Isolate: Genomic and Pathogenic Features. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11:629116. doi: 10.3389/fcimb.2021.629116

Magdaleno-Villar, J. J., Peña-Lomelí, A., Castro-Brindis, R., Castillo-González, A. M., Galvis-Spinola, A., Ramírez-Pérez, F., Hernández-Hernández, B. (2006). Efecto de soluciones nutritivas sobre el desarrollo de plántulas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 223- 229.

Malik, M., Haider, S., Rehman, A., Rehman, S., Jamil, M., Naz, I., y Anees, M. (2022). Biological control of fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by chitinolytic bacterial strains. *Journal of Basic Microbiology*, 62: 48– 62, <https://doi.org/10.1002/jobm.202100512>.

Malvick, D. (2023). *Rhizoctonia* root and stem rot on soybean. <https://extension.umn.edu/pest-management/rhizoctonia-root-and-stem-rot-soybean>. Consultado 15/01/2023.

Mantilla- Paredes, A., Cardona, G., Peña Venega, C., Murcia, U., Rodríguez, M., y Zambrano, M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical* 57 (4): 915- 927.

Márquez, R., Blanco, E. L., y Aranguren, Y. (2020). *Bacillus* strain selection with plant growth-promoting mechanisms as potential elicitors of systemic resistance to gray mold in pepper plants. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27 (8): 1913- 1922, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.06.015>.

Martinez-Absalon, S. C., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Martinez-Pacheco, M. M., arias-Rodriguez, R., Govindappa y M., Santoyo, G. (2012). Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genetics and Molecular Research Journal*, <http://dx.doi.org/10.4238/2012.July.10.15>

Martinez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28 (1): 1- 11.

Martínez-Ramón, L. L., Martínez Peniche, A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Medrano, S. M., y Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnológica Mexicana* 36 (1), 63- 69.

Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal, ESJ*, 12(18), 232. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n18p232>

Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T., Moreno- Medina, V., Hernández-Delgado, S., y Mayek-Pérez, N. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: el caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología* 48 (4), 347- 357, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>.

Martinuz, A. (2020). Interactions between the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* strain 162 and the endophytic bacterium *Rhizobium etli* strain G12. *La Calera* 20 (34): 1- 9, <https://doi.org/10.5377/calera.v20i34.9601>.

Marzani, Q., Othman, A., y Hamda, O. (2017). Comparison between chemical and non- chemical control of cypress seedling damping- off. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences* 29 (4): 322- 330, <http://dx.doi.org/10.21271/ZJPAS.29.s4.36>.

MERI. (2022). Método de Evaluación Rápida de Invasividad para especies exóticas en México: *Bryophyllum delagoense* e (Eckl. & Zeyh). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/221045/Kalanchoe_delagoense.pdf. Consultado 11/10/2022.

Mishra, P., Mishra, J., y Naveen Kumar , A. (2021). Plant growth promoting bacteria for combating salinity stress in plants Recent developments and prospects: A review. *Microbiological Research* 252: 126861, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126861>.

Mogrovejo, D. C., Perini, L., Gostinčar, C., Sepčić, K., Turk, M., Ambrožič-Avğuštin, J., ... & Gunde-Cimerman, N. (2020). Prevalence of antimicrobial resistance and hemolytic phenotypes in culturable arctic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 11, 570.

Montero-Tavera, V., Guerrero-Aguilar, B., Anaya-López, J., Martínez-Martínez, T., Guevara-Olvera, L., y González-Chavira, M. (2013). Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas* 4 (7): 10043- 1054.

Moshe, M, Gupta CL, Jain RM, Sela N, Minz D, Banin E, Frenkel O and Cytryn E (2023). Comparative genomics of *Bacillus cereus sensu lato* spp. biocontrol strains in correlation to in-vitro phenotypes and plant pathogen antagonistic capacity. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2023.996287.

Nascimento, J. D., Goncalves, K. C., Dias, N. P., de Oliveira, J. L., Bravo, A. y Polanczyk, R. A. (2022). Adoption of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in agricultural systems and new approaches to improve their use in Brazil. *Biological Control* 165 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104792>.

Olanrewaju, O. S., y Babalola , O. O. (2022). The rhizosphere microbial complex in plant health: A review of interaction dynamics. *Journal of Integrative Agriculture* 21(8) 2168– 2182, [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63817-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63817-0).

Orozco, Jesus. (2022). Megalurothrips usitatus Bagnall (*Thysanoptera: Thripidae*), first record of an important new pest in Honduras. <https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2419&context=insectamundi>. Consultado el día 16/10/2022.

Otero, P. (2023). *Oidio o mal blanco: Principal causa de manchas blancas en las hojas*. Obtenido de <https://www.agrohuerto.com/manchas-blancas-en-las-hojas>. Control 07/02/2023.

Patel , M., Patel, K., Al-Keridis, L., Alshammari, N., Badraoui , R., Elsbali, A., Al-Soud, W., Hassan, M. I., Yadav, D. K., Adnan, M. (2022). Cadmium-Tolerant Plant Growth-Promoting Bacteria *Curtobacterium oceanosedimentum* Improves Growth Attributes and Strengthens Antioxidant System in Chili (*Capsicum frutescens*). *Sustainability* 14 (7), 4335, <https://doi.org/10.3390/su14074335>.

Pedraza, L., López, C., y Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta biológica Colombiana* 25 (1): 112-125, <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>.

Pereira- Goulart, A. (2022). Effectiveness of fungicide seed treatment in the control of soybean seedling damping- off caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions. *Summa Phytopathologica* 48 (3): 121- 125, <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/266033>.

Pérez-Cano, H.J. (2014). Establecimiento de una reacción en cadena de la polimerasa para la detección de bacterias y hongos. *Revista Mexicana de Oftalmología* 88 (2): 67- 72, <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2013.12.001>.

Ponce-Martins, P., Aguiar-Beserra, J., da Silva-Matos, K., Intra-Moreira, S., Reis, A., Bruschi-Infante, N., . . . Pereira-de Melo, M. (2022). *Rhizoctonia* spp. causing damping-off, root rot and web blight on coriander in Brazil. *Journal of Plant Pathology*: <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01228-6>.

Poria, V., Jhilita, P., Kumar, S., Kumar, P., Singh, S., Rana, Asz,Thankappan, S., Kumar-Goswami, A. (2024). Abiotic stress tolerance and antifungal activities of rhizobacteria for the management of soil-borne pathogens. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2024.05.002>

Poveda, J. y González-Andrés, F. (2021) *Bacillus* como fuente de fitohormonas para uso en agricultura, *Applied Microbiology and Biotechnology* 105 (23): 8629–8645 <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>.

Quazi-Majaz, A., y Molvi, K. (2011). The miracle plant *Kalanchoe pinnata*: A phytochemical and pharmacological review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 2 (5): 1478- 1482 <https://www.researchgate.net/publication/268347927>.

Quispe-Quispe, E., Moreira-Morrillo, A. A., Garcés-Fiallos, F. R., (2022). A review about biocontrollers of *Phytophthora capsici* and its impact on *Capsicum* plants: A perspective from outside to inside the plant. *Scientia Agropecuaria* 13 (3): 275- 289 <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.025>.

Quiza, L., St-Arnaud, M., y Yergeau, E. (2015). Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. *Frontiers in Plant Science* 6: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00507>.

Rana, A., Sudakov, K., Carmeli, S., Brown-Miyara, S., Bucki, P., Minz, D. (2024) Los compuestos orgánicos volátiles de la bacteria del suelo *Bacillus halotolerans* suprimen los patógenos y provocan genes que responden a las defensas en las plantas. *Investigación microbiológica* 281 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127611>

Ranjan-Deb, C., Tatung, M. (2024) Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review,. *South African Journal of Botany*165: 153-162, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.12.031>.

Richardson, D.M., Kluge, R.L., 2008. Seed banks of invasive Australian Acacia species in South Africa: role in invasiveness and options for management. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* 10: 161–177. <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2017.09.002>.

Rilling, J. I., Acuña, J. A., Nannipieri, P., Cassan, F., Maruyama, F., y Jorquera, M. A. (2019). Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 130: 205- 219 <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>.

Rodicio, M. R., Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Formación médica continuada* 22 (4) : 238- 245.

Rolfe , S., Griffiths , J., y Ton , J. (2019). Crying out for help with root exudates: Adaptive mechanisms by which stressed plants assemble health-promoting soil microbiomes. *Current Opinion in Microbiology* 49: 73–82, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.003>.

Rong, J., Shahzad, M., Pengfei, H., Huanwen, Y., Yixin, W., Junwei, W., Pengbo, H., Yongzhan, C., Ge, W., Yueqiu, H. (2020). Biocontrol potential of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 against tobacco powdery mildew and its growth promotion. *Biological Control* 143: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104160>.

Rossini, M., Azar, G., Iglesias, N., Giayetto, A., Azpilicueta, C., González, M., Ohaco, P. y Ruiz, C. (2023). *Enfermedades de mayor importancia de los principales cultivos hortícolas de la región Patagonia Norte*. <http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/fitopatologia/wpcontent/uploads/sites/30/2018/03/Enfermedades-en-cultivos-hortícolas.pdf> . Consultado 10/04/2023.

Saavedra- Del Real, G., Ayala, C., y Kehr- Mellado, E. (2023). *Hortalizas para Procesamiento Agroindustrial*. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6818>. Consultado 09/02/2023.

SAGARPA. (2022). *Campaña Manejo Fitosanitario del Jitomate Manual de Plagas y Enfermedades en Jitomate*. <https://hopelchen.tecnm.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r130745.PDF>. Consultado: 12/11/2022.

Saltos, L. A., Monteros- Altamirano, A., Reis, A., Garcés-Fiallos, F. R., *Phytophthora capsici*: the diseases it causes and management strategies to produce healthier vegetable crops. *Horticultura brasileira* 40: 005- 017 <https://dx.doi.org/10.1590/s0102-0536-20220101>

Sánchez-Espinosa. A., Villarruel-Ordaz, J., y Maldonado-Bonilla, L. (2020). The cause and potential solution to the *Fusarium* wilt disease in banana plants. *Terra*

Latinoamericana Número Especial 38 (2): 435- 442,
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.617>.

SEMARNAT, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2000). Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis (NOM-021- SEMARNAT-2000). Consultado el 20 marzo 2023 <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>

Sharma, N., y Jha, P. (2011). Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of *Kalanchoe spanthulata* Leaves Extract. *Journal of Advanced Scientific Research* 2 (4): 71- 73, <https://doi.org/10.2147/jep.s361194>.

SIAP. (2022a). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Estadística de uso tecnológico y servicios en la superficie agrícola. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>. Consultado 10/10/2022.

SIAP. (2022b) *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Cierre de producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado 10/10/2023.

SIAP. (2023). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Noveno productor de hortalizas a nivel mundial. <https://www.gob.mx/siap/articulos/somos-noveno-productor-de-hortalizas-a-nivel-mundial>. Consultado 11/03/2023.

Soni ,K., Bagaria A. (2024). GC-MS based identification of anti-microbial bioactive compounds, isolated from *Bacillus halotolerans* of marine sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 577 <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2024.152026>

Sosa-López, A., Álvarez-Rivera, P., Borges-Marín, V., González-García, G., y Ponce-Grijuela, E. (2011). Evaluación del método de conservación en papel de filtro en dos cepas de *Bacillus subtilis* Cohn mediante la actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* Kühn. *Fitosanidad*, 15(1): 45-50.

Sun, H., He, Y., Xiao, Q., Ye, R. y Tian, Y. (2013). Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. *African Journal of Microbiology Research* 7 (16): 1496- 1504.

Syed-Ab-Rahman, S. F. Xiao, Y., Carvalhais, L. C., Ferguson, B. J. (2019). Suppression of *Phytophthora capsici* infection and promotion of tomato growth by soil bacteria. *Rhizosphere* 9: 72- 75 <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.007>

Syngenta. (2023). *Cómo afectan los daños de plagas en el cultivo de lechuga* . <https://blog.syngenta.es/como-afectan-los-danos-de-plagas-en-el-cultivo-de-lechuga/>. Consultado 09/05/2023.

Szilagyi-Zechin, V. J., Ikeda, A. C., Mógor, A. M. (2022). *Biochemical and developmental alterations of two tomato cultivars under after inoculation with different doses of Bacillus spp.* *IDESIA* 40: 59- 66. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292022000100059>

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30 (12): 2725-2729.

Tejera-Hernández, B., Heydrich-Pérez, M., y Rojas-Badía, M. (2013). Phosphate solubilization by rice associate *Bacillus*. *Agronomía Mesoamericana* 24 (2): 257-364, <https://doi.org/10.15517/am.v24i2.12535>.

Teodoro-Rocha, G., Coelho-Linhares-Montalvão, S. C.y Martins-Queiroz, P. R. (2023). Morphological and biochemical characterization of bacterial species of *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Brevibacillus*. *Revista Ceres* 70(3): 91-104. DOI: 10.1590/0034-737x202370030010

Urcia, F. A. y Guevara, R.M.(2002). Efiacia de medios de cultivo con infusiones de variedades de papa en la identificacio pon de *Trichophyton rubrum*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 19 (4): 206- 208.

Vargas-Ayala R, Rodríguez-Kábana R, Morgan-Jones G, McInroy JA and Kloepper JW. 2000. Shifts in Soil Microflora Induced by Velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in

Cropping Systems to Control Root-Knot Nematodes. *Biological Control*. 17:11-22. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0769>

Vasconcelos-Fernandes, A., Gomes- Lisboa, P., Marqués de Andrade, P., Zanotto-Vigna, B., Regina- Nogueira, S., Pereira- Fávero, A. yTeixeira- Lacava, P. (2023). Bacterias endófitas con *Paspalum vaginatum* Swartz con potencial para la promoción del crecimiento vegetal y biocontrol. *Revista Brasileña de Investigación Animal y Ambiental* 6 (2): 1072- 1089.

Vera-Sánchez, K., Cadena-Iñiguez, J., Latournerie-Moreno, L., Santiaguillo-Hernández, J., Rodríguez-Contreras, A., Basurto-Peña, F., Castro-Lara, F. A., Rodríguez-Guzmán, D., López-López, E., Porfirio, A. y Rios-Santos, E. (2022). *Conservación y utilización sostenible de las hortalizas nativas de México*. https://www.fec-chiapas.com.mx/sistema/biblioteca_digital/conservacion-y-utilizacion-sostenible-de-las-hortalizas-nativas-de-mexico.pdf. Consultado 15/11/2022.

Vessey, J. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586, <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>.

Villarreal- Delgado, M., Villa-Rodríguez, E., Cira-Chávez, L., y Estrada-Alvarado, M. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36 (1): 95- 130, <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>.

Vinchira-Villagrana, D. M., Castellanos, L., Moreno-Sarmiento N., Suarez-Moreno, Z. R., Ramos, F. A. (2021) Antifungal activity of marine-derived *Paenibacillus* sp. PNM200 against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici, the causal agent of tomato vascular wilt, *Biological Control* 154: doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104501>.

Wan, J.-Z., Wang, C.-J., y Yu, F.-H. (2017). Wind effects on habitat distributions of wind-dispersed invasive plants across different biomes on a global scale:

Assessment using six species. *Ecological Informatics* 42, 38–45, doi:10.1016/j.ecoinf.2017.09.002.

Wang, J., Qin, S., Fan, R., Peng, Q., Hu, X., Yang, L., Liu, Z., Baccelli, I., Migheli, Q. Berg, G., Chen, X. y Cernava, T. (2023). Plant Growth Promotion and Biocontrol of Leaf Blight Caused by *Nigrospora sphaerica* on Passion Fruit by Endophytic *Bacillus subtilis* Strain GUCC4. *Journal of Fungi* 9, 132, <https://doi.org/10.3390/jof9020132>.

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., y Lane, D. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173 (2), 697- 703, <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.

Wen, A., Xie, C., Mazhar, M., Wang, C., Zeng, H., Qin, L. y Zhu, Y. (2020). Tetramethylpyrazine from adlay (*Coix lacryma-jobi*) biotransformation by *Bacillus subtilis* and its quality characteristics. *Journal of food science and technology* <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04443-0>.

Wilson, J.R.U., Dormontt, E.E., Prentis, P.J., Lowe, A.J. yRichardson, D.M., (2009). Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends Ecology Evolution* 24: 136–144.

Wiyono, S., Darma, K., Maharijaya, A., Khamid, T., y Ridwan, A. (2021). Peningkatan Pertumbuhan dan Pengendalian Rebah Kecambah Bibit Cabai Menggunakan Teknologi Agens Hayati pada Berbagai Ketinggian Tempat. *Jurnal Hortikultura Indonesia* 12 (2): 138- 146, <http://dx.doi.org/10.29244/jhi.12.2.138-146>.

Wu, X., Fan, Y., Wang, R., Zhao, Q., Ali, Q., Wu, H., Gu, Q., Borriss, R., Xie, Y. y Gao, X. (2022). *Bacillus halotolerans* KKD1 induces physiological, metabolic and molecular reprogramming in wheat under saline condition. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2022.978066.

Xie, H., Liu, H., Liu, G., Li, X (2024). Degradation of organic compounds by a novel *Bacillus cereus* BX16 in starch waste. *Process Biochemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.05.016>.

Yang, Y., Li, X., Liu, J., Zhou, Z., Zhang, T., y Wang, X. (2017). Bacterial diversity as affected by application of manure in red soils of subtropical China. *Biology and Fertility of Soils* 53: 639- 649, <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1209-x>.

Yu, S., Zhen, C., Zhao, P., Li, J., Qin, Z., y Gao, H. (2023). Antifungal mechanisms of γ -aminobutyric acid against the postharvest pathogen *Alternaria alternata*. *LWT-Food Science and Technology* 173: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114314>.

Zhao Y., Yang, Y., Ye, M., Wang, K., Fan, L., y Su, F. (2021). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Origanum vulgare* against *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry* 365: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130506>.

Zhao, L., Li, J., Tian, N., Li, G., Sheng, L., He, C., Bian, H. (2024). Effect of experimental warming on dissolved organic matter and bacterial diversity in a forest swamp soil, *Ecological Indicators* 158, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111375>.

IX. Anexos

Anexo 1. Análisis multivariado de componentes de propiedades bioquímicas de crecimiento vegetal e Inhibición de fitopatógenos, de los diferentes aislados de *Bacillus*.

