

# Actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México

## *In vitro* antifungal activity of antagonistic microorganisms against *Fusarium oxysporum* from avocado trees rhizosphere of Xalisco, Nayarit, Mexico

María Guadalupe Vega-Torres, Universidad Tecnológica de la Costa, División de Ingenierías en Ciencias Agropecuarias, C.P. 63313, Santiago Ixcuintla, Nayarit, México, María Fernanda Ruiz-Cisneros, Daniel Alonso Pérez-Corral, David Ignacio Berlanga-Reyes, José de Jesús Ornelas-Paz, Claudio Rios-Velasco\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo-CIAD; A.C., C.P. 31570, Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Octavio Jhonathan Cambero-Campos, Mario Orlando Estrada-Virgen, Gregorio Luna-Esquivel, Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. C.P. 63155. Xalisco, Nayarit, México. Frédérique Lucciene Denise-Revérchon, Instituto de Ecología, A.C., C.P. 91070 Xalapa, Veracruz, México. \*Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx

Recibido: 04 de Abril, 2019.

Aceptado: 23 de Mayo, 2019.

Vega-Torres MG, Ruiz-Cisneros MF, Pérez-Corral DA, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Rios-Velasco C, Cambero-Campos OJ, Estrada-Virgen MO, Luna-Esquivel G y Denise-Revérchon FL. 2019. Actividad antifúngica *in vitro* de microorganismos antagonistas contra *Fusarium oxysporum* de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1): 57-64.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-3

**Resumen.** El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar hongos y bacterias antagonistas de la rizosfera de huertos de aguacate de Xalisco, Nayarit, México, capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de aislados de *Fusarium oxysporum*. En 2018, se recolectaron muestras de suelo asociado a la

rizosfera de árboles sanos de 10 huertos de aguacate cv. Hass en el municipio de Xalisco, Nayarit, México para el aislamiento de posibles antagonistas de *F. oxysporum*. Se aislaron e identificaron morfológicamente 117 actinomicetos (*Streptomyces* spp.), 83 bacterias (*Bacillus* spp.) y 43 hongos (*Trichoderma* spp.). De cada grupo de microorganismos se evaluaron 10 aislados (al azar) contra tres aislados de *F. oxysporum*, y se caracterizaron molecularmente 10 de estos aislados que mostraron la mayor inhibición. De los antagonistas evaluados *in vitro*, destacó el aislado A75 (*Streptomyces* sp.), con PICR que fluctuaron de 26.82 a 67.52%; los aislados B65 y B78 (*Bacillus amyloliquefaciens* y *B. velezensis*, respectivamente) con inhibiciones >50% y los 10 aislados de *Trichoderma*, que inhibieron el crecimiento radial (PICR) de *F. oxys-*

*porum* entre 35 a 75%. En huertos de aguacate de Xalisco, Nayarit, existen microorganismos antagonistas, especialmente cepas de los géneros *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp., con posible potencial para ser usados en el manejo de *Fusarium* spp.

**Palabras clave:** Biocontrol, antagonista, hongo, actinomicetos, bacterias, enfermedades.

**Abstract.** The aim of the study was to isolate and characterize antagonistic fungi and bacteria from the rhizosphere of avocado orchards of Xalisco, Nayarit, Mexico, capable of inhibiting the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* isolates. In 2018, soil samples associated with the rhizosphere of healthy trees from 10 cv. Hass avocado orchards were collected in the municipality of Xalisco, Nayarit, Mexico for the isolation of possible antagonists of *F. oxysporum*. One hundred and seventeen isolates of actinomycetes (*Streptomyces* spp.), 83 bacteria (*Bacillus* spp.), 43 fungi (*Trichoderma* spp.), were isolated and identified morphologically. Ten isolates (randomly) from each group of antagonistic microorganisms were evaluated against three isolates of *F. oxysporum* and 10 of these isolates that showed the greatest inhibition were molecularly characterized. Of the antagonists evaluated *in vitro*, the isolate A75 (*Streptomyces* sp.) highlighted with PIRG that ranged from 26.82 to 67.52%; the isolates B65 and B78 (*B. amyloliquefaciens* and *B. velezensis*, respectively), showed inhibitions >50% and the 10 *Trichoderma* isolates that inhibited the radial growth (PIRG) of *F. oxysporum* between 35 to 75%. In avocado orchards in Xalisco, Nayarit, there are antagonistic microorganisms, especially strains of the *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. and *Streptomyces* spp. genera with putative potential to be used in the management of *Fusarium* spp.

**Key words:** Biocontrol, antagonists, fungus, actinomycetes, bacteria, diseases.

El aguacate (*Persea americana* Mill; Laurales: Lauraceae), es la cuarta fruta más importante en el mundo con una producción global anual de 4.7 millones de toneladas. Este frutal se considera uno de los cultivos con mayor impacto comercial en México, ya que se cultiva en 26 de sus 32 estados, entre los que destacan Michoacán, Jalisco, Estado de México, Nayarit, Guerrero, Morelos, Chiapas, Puebla, Oaxaca y Durango, estados que aportan más del 97% de la producción (Macías-Macías, 2011). En México, la producción de este frutal se ve limitada y amenazada por el riesgo inminente de ingreso y permanencia de los complejos ambrosiales, los cuales están integrados por un insecto vector (escarabajo) y un hongo fitopatógeno (*Xyleborus glabratus*-*Raffaelea lauricola* y *Euwallacea kuroshio*-*Fusarium euwallaceae*) (Eskalen *et al.*, 2013). Estas asociaciones simbióticas fueron reportadas por Fraedrich *et al.* (2008) para *R. lauricola* y *X. glabratus* donde las hembras del escarabajo son las responsables del transporte de las esporas del hongo, por su parte Freeman *et al.* (2016) reportaron la asociación de *F. euwallaceae* y *Euwallacea nr. fornicatus*; en ambos casos el hongo se encuentra dentro de los micangios del insecto. Los ambrosiales dependen completamente de sus hongos simbióticos para su nutrición, a diferencia de otros escarabajos que se alimentan de la corteza de los árboles (Hughes *et al.*, 2017). En Tijuana, Baja California, México, García-Ávila *et al.* (2016) reportaron la presencia de *E. nr. fornicatus*, sin registro de daños o infestación, sin embargo, existe la preocupación de su diseminación por el territorio nacional, ya que se ha reportado que en regiones donde se han detectado estos complejos, han ocasionado daños e incluso la muerte de plantas hospederas (susceptibles), prin-

principalmente cultivos como cítricos (*Citrus* spp.), aguacate (*P. americana*) y cacao (*Theobroma cacao* L.) (Harrington *et al.*, 2008; Eskalen *et al.*, 2013; Freeman *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 2017). Por estas razones es necesario e imprescindible buscar alternativas para afrontar esta problemática, aunado al principio básico de prevención del control biológico. Una alternativa promisorio para el manejo de fitopatógenos en el cultivo de aguacate en México, es el uso de microorganismos antagonistas, entre los cuales destacan los hongos del género *Trichoderma* (Rios-Velasco *et al.*, 2016; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017), y las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces* (Pérez-Corral *et al.*, 2015). Estos microorganismos han mostrado capacidad antifúngica *in vitro* al ser evaluados contra hongos fitopatógenos (Dávila-Medina *et al.*, 2013; Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017), mediante diversos mecanismos como parasitismo, competencia por nutrientes y espacio, producción de sustancias antimicrobianas y resistencia inducida en la planta hospedera, que en consecuencia, reducen tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). En la rizosfera de huertos de aguacate del estado de Nayarit, México, podrían encontrarse microorganismos antagonistas con potencial para

ser usados en el manejo de los hongos *R. lauricola* y *F. euwallaceae*, asociados con los insectos ambrosiales *X. glabratus* y *E. kuroshio*, respectivamente. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue, aislar, caracterizar y seleccionar cepas antagonistas de los géneros *Streptomyces*, *Trichoderma* y *Bacillus*, asociados a la rizosfera de árboles de aguacate de Xalisco, Nayarit, México y evaluar su capacidad antifúngica *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, con posible uso para el manejo de *Fusarium* spp.

En 2018, se eligieron 10 huertos de aguacate cv. Hass en el municipio de Xalisco, Nayarit, México. En cada huerto, se recolectaron muestras de suelo (~1 kg) asociado a la rizosfera (10-15 cm de profundidad) de árboles sanos (Cuadro 1). Las muestras, se procesaron en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, Sede Chihuahua-Campus Cuauhtémoc). A partir de las cinco muestras de suelo recolectadas en cada huerto, se mezclaron, y se obtuvo una sub-muestra compuesta de 250 g por cada huerto.

El aislamiento de hongos antagonistas se efectuó a partir de diluciones seriadas de suelo en medios de cultivo generales Papa Dextrosa Agar (PDA), V8-agar (V8) y agar de malta (AM), y el aislamiento de bacterias y actinobacterias en Czapek

**Cuadro 1. Localización geográfica de huertos de aguacate cv. Hass muestreados en el municipio de Xalisco, Nayarit, México, 2018.**

Sitios de muestreo	Huerto	Coordenadas	Altitud (msnm)
La Curva	1 <sup>x</sup>	21° 22' 12" N, 104° 53' 38" O	1,030
Carrizal 1	1	21° 23' 01" N, 104° 05' 01" O	1,201
Carrizal 2	1	21° 22' 50" N, 104° 56' 01" O	1,194
Carrizal 3	1	21° 22' 09" N, 104° 55' 32" O	1,152
El Devisadero 1	1	21° 26' 30" N, 104° 54' 34" O	1,058
El Devisadero 2	1	21° 54' 16" N, 104° 54' 16" O	1,056
Xalisco	1	21° 26' 39" N, 104° 54' 06" O	984
El Cedro	1	21° 45' 40" N, 104° 44' 10" O	1,078
Camichín de Jauja	1	21° 28' 25" N, 104° 47' 45" O	1,008
Tintilagua de Arriba	1	21° 29' 18" N, 104° 46' 16" O	1,154

msnm: metros sobre el nivel del mar; <sup>x</sup> número asignado al huerto muestreado.

Dox Agar (CDA) y Luria Bertani agar (LB), respectivamente. Las colonias con morfología típica de los microorganismos de interés, se aislaron y se sembraron en los medios de cultivo arriba descritos (Watanabe, 2010; Pridham *et al.*, 1958; Shirling y Gottlieb, 1966).

De cada grupo de posibles antagonistas (hongos, bacterias y actinomicetos) se tomaron al azar, 10 aislados y se confrontaron contra tres aislados de *F. oxysporum*, [F1, F2 y F3 con claves de acceso (MK942348.1, MK942349.1 y MK942350.1, respectivamente) del GenBank] obtenidos de la rizosfera de árboles de aguacate cv. Hass en Xalisco, Nayarit, México. La identificación morfológica de los hongos, bacterias y actinomicetos, se hizo de acuerdo con sus caracteres morfológicos macroscópicos típicos, tales como producción de pigmentos y color del micelio aéreo y de sustrato, así como de sus caracteres microscópicos (forma, tamaño y arreglo de conidios/bacilos) para lo cual realizaron montajes en portaobjetos de los tres grupos de microorganismos y se observaron en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones y la ayuda de claves taxonómicas (Watanabe, 2010; Pridham *et al.*, 1958; Shirling y Gottlieb, 1966).

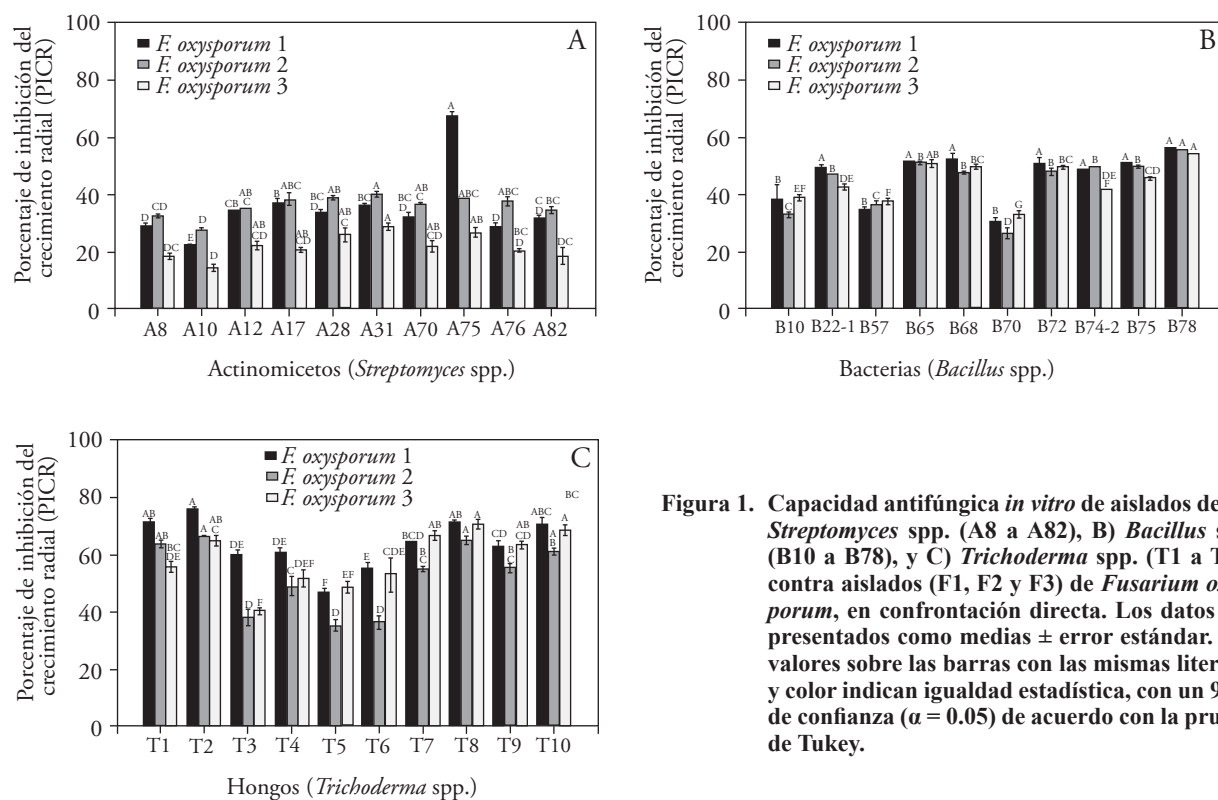
Las confrontaciones con *Streptomyces* spp., se realizaron de acuerdo con Pérez-Corral *et al.* (2015). Las confrontaciones de *Bacillus* spp., contra *Fusarium* fueron similares a las de *Streptomyces*, solo que los explantes de *Bacillus* (6 mm de diámetro) se colocaron en los puntos cardinales al mismo tiempo que el *Fusarium* (6 mm) (Rios-Velasco *et al.*, 2016). Las confrontaciones duales de *Trichoderma* contra los aislados de *Fusarium*, se realizaron de acuerdo con Rios-Velasco *et al.* (2016) y Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). El crecimiento micelial de *F. oxysporum* se midió sistemáticamente cada 24 h para estimar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) en los tres experimentos.

Los aislados que mostraron capacidad antifúngica *in vitro* a *F. oxysporum* se identificaron molecularmente. A los hongos, se les extrajo el ADN genómico (ADNg) de acuerdo con Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). Subsecuentemente se amplificó el espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ARN ribosomal (ARNr), usando los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3'). La identificación molecular de bacterias y actinomicetos se hizo mediante la extracción del ADNg de acuerdo con Pérez-Corral *et al.* (2015). Posteriormente, se utilizó para amplificar el gen del 16S del ARNr por PCR, usando los iniciadores universales EU(F) (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y EU(R) (5'-TACCTTGTTACGACTTCACC-3'). Tanto el ADNg como los productos de PCR de los tres grupos de antagonistas, se examinaron por electroforesis en geles de agarosa a 1%, en un ChemiDoc™ XRS+ imaging system (Bio-Rad; CA, EUA). Estos productos fueron secuenciados en MacroGen EUA (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra las bases de datos del NCBI usando el algoritmo de BLAST para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a cada especie y fueron depositadas en el GenBank del NCBI. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Como diseño experimental se usó un completamente al azar con tres repeticiones, cada antagonista fue un tratamiento, la unidad experimental fue una caja Petri y cada repetición constó de tres unidades experimentales (en total 9 cajas Petri por confrontación) y como testigo se consideraron 10 cajas de cada aislado de *F. oxysporum* (sin la presencia del antagonista). Los datos obtenidos del PICR se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y se usó la prueba Tukey ( $p=0.05$ ) para separar las medias. Los análisis se realizaron con el programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0.

De las muestras de suelo asociado a la rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México, se obtuvieron 247 microorganismos de los géneros *Streptomyces* spp. (117 aislados), *Bacillus* spp. (83 aislados), y *Trichoderma* spp. (47 aislados), algunos de estos al ser evaluados *in vitro* contra los aislados de *F. oxysporum*, mostraron acción antifúngica. De acuerdo con Buyer (1995) la eficiencia de los medios semi-selectivos, es debida a las diferencias en requerimientos nutricionales para el crecimiento de microorganismos y a la disponibilidad de nutrientes en el medio, lo cual tiene un efecto positivo en el aislamiento de microorganismos específicos.

De las pruebas de antagonismo, se obtuvieron algunos aislados de los géneros *Streptomyces* (2), *Bacillus* (4) y *Trichoderma* (4), con actividad antifúngica *in vitro* contra *F. oxysporum* (Figura 1).

La inhibición *in vitro* de *Streptomyces* spp. sobre los tres aislados de *F. oxysporum* fluctuó de 14.45 a 67.5%, siendo el aislado A75 (*Streptomyces* sp.) el que presentó la mayor actividad antifúngica al confrontarse contra *F. oxysporum* (aislado F1; Figura 1). El resto de los aislados de *Streptomyces* mostraron PICR <40%. La inhibición de los aislados de *Streptomyces* sobre *F. oxysporum* (aislado F3) no superó el 28%. Nuestros resultados son similares a los reportados por Dávila-Medina *et al.* (2013) que al evaluar la actividad *in vitro* de actinomicetos contra *Fusarium* sp., encontraron inhibiciones <49.36%. Pérez-Corral *et al.* (2015) reportaron diferencias en la capacidad antifúngica de sus cepas de *Streptomyces* al evaluarlos contra *F. equiseti*. De acuerdo con Koontz y Marcy (2003) la acción antifúngica de *Streptomyces* depende del tipo de enzimas producidas (amilasa, asparaginasa,



**Figura 1.** Capacidad antifúngica *in vitro* de aislados de: A) *Streptomyces* spp. (A8 a A82), B) *Bacillus* spp. (B10 a B78), y C) *Trichoderma* spp. (T1 a T10) contra aislados (F1, F2 y F3) de *Fusarium oxysporum*, en confrontación directa. Los datos son presentados como medias  $\pm$  error estándar. Los valores sobre las barras con las mismas literales y color indican igualdad estadística, con un 95% de confianza ( $\alpha = 0.05$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey.

atalasa) y compuestos antifúngicos que contaminan el medio y al mismo tiempo inhiben el crecimiento del hongo. Los aislados de *Bacillus* spp., mostraron inhibiciones *in vitro* >26%, pero <56% contra los tres aislados de *F. oxysporum*. Del género *Bacillus* destacaron los aislados B65 y B78 correspondientes a *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis* que mostraron PICR >50% contra los tres aislados de *F. oxysporum* (Figura 1b). Estos porcentajes se encuentran dentro de lo reportado por Ruiz-Cisneros *et al.* (2017), al evaluar las cepas *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* contra *Phytophthora cactorum* y *Pythium* sp., con 92.3 y 18.8 %, respectivamente. Korsten *et al.* (1997) demostraron el potencial de *Bacillus* spp., para el control de enfermedades fungosas en aguacate, en pre y poscosecha hasta en un 72%. La inhibición *in vitro* mostrada por *Bacillus* spp., depende de su capacidad para producir metabolitos antifúngicos como iturina A, surfactina, lipopéptidos cíclicos, y/o fengicina (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

De los tres grupos de antagonistas evaluados *in vitro*, destacaron los hongos del género *Trichoderma* spp., al inhibir el crecimiento de los tres aislados de *F. oxysporum* con los mayores porcentajes en comparación con los otros antagonistas evaluados. Esta habilidad se atribuye a la síntesis de sustancias antibióticas en algunas especies de este género (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017). El PICR ejercido por estos aislados sobre *Fusarium* spp., fluctuó de 35 a 75% (Figura 1c). El aislado F1 de *F. oxysporum* fue el más susceptible a los 10 aislados de *Trichoderma* spp., donde el PICR fue >47%. Mientras que el menos susceptible fue *F. oxysporum* (aislado F2). Ruiz-Cisneros *et al.* (2017) reportaron un comportamiento similar, al evaluar cuatro cepas de *Trichoderma* contra *P. cactorum* con inhibiciones >80%. Almaraz *et al.* (2012) demostraron que la

capacidad de cepas de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento micelial de *P. cinnamomi*, se debe a la producción de compuestos volátiles y antibióticos. Algunas cepas de *Trichoderma*, en especial las de *T. harzianum* producen el antibiótico 6-pentil- $\alpha$ -pirona, el cual tiene un efecto en la inhibición del crecimiento del hongo, además de regular los genes responsables de la biosíntesis de trichotecenos, micotoxinas con actividad antimicrobial de amplio espectro (Almaraz *et al.*, 2012). Gajera y Vakharia (2010), mencionan que la acción antifúngica de algunas especies de *Trichoderma* se debe a la producción de enzimas extracelulares y compuestos antifúngicos.

Los aislados de *Streptomyces* (2), *Bacillus* (4) y *Trichoderma* (4) que mostraron capacidad antagónica *in vitro* contra *F. oxysporum* se identificaron molecularmente mediante la comparación de sus secuencias con las registradas en el NCBI, confirmando su identificación morfológica (Cuadro 2), donde destacaron, *S. olivicoloratus* (aislado A31) y *Streptomyces* sp. (aislado A75). Los aislados B65 y B72 del género *Bacillus* correspondieron a la especie *B. amyloliquefaciens*, mientras que los aislados B68 y B78 correspondieron a *B. subtilis* y *B. velezensis*, respectivamente. Del género *Trichoderma* se identificaron las especies *T. koningiopsis* (aislado T1), *T. parareesei* (aislado T8), *T. lixii* (aislado T10) y *T. harzianum* (aislado T2), destacando éste último por su gran potencial en el control biológico contra hongos fitopatógenos, que junto con *T. asperellum* son las especies con mayor distribución en México (Hernández-Castillo *et al.*, 2011).

En la rizosfera de huertos de aguacate cv. Hass de Xalisco, Nayarit, México, existe una gran diversidad de microorganismos de los géneros *Streptomyces*, *Bacillus* y *Trichoderma* antagónicos a *F. oxysporum* y que podrían ser antagónicos a otras especies de este hongo.

**Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de aislados de *Streptomyces* spp., *Bacillus* spp. y *Trichoderma* con potencial antifúngico contra *Fusarium oxysporum* aislados de rizosfera de aguacate cv. Hass en Xalisco, Nayarit, México.**

Clave del aislado	Procedencia	Morfológica	Identificación Molecular	Identidad (%)	Clave de acceso del GenBank
Actinomicetos					
A31	El Devisadero 1	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces olivicoloratus</i>	99	MK941877.1
A75	Tintilagua de Arriba	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp.	98.8	MK941878.1
Bacterias					
B65	Xalisco 1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	MK941879.1
B68	Carrizal 1	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus subtilis</i>	100	MK941880.1
B72	El Devisadero 2	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	MK941881.1
B78	Tintilagua de Arriba	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus velezensis</i>	99.02	MK941882.1
Hongos					
T1	Carrizal 2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99	MK942345.1
T2	El Devisadero 2	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>	98.7	MK942346.1
T8	Xalisco 1	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma parareesei</i>	98	Sin clave
T10	Tintilagua de Arriba	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma lixii</i>	99	MK942347.1

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue apoyado por el Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico y de Innovación-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) (Proyecto FORDECYT; Clave 292399).

## LITERATURA CITADA

- Almaraz SA, Alvarado RD, Tlapal BB y Espinoza VD. 2012. Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino del Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestal y del Ambiente* 18 (3): 341-355. <https://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.061>
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B and Fickers P. 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8(1): 12-63. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-63>
- Buyer JS. 1995. A soil and rhizosphere microorganism isolation and enumeration medium that inhibits *Bacillus mycoides*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5): 1839-1842. <https://aem.asm.org/content/aem/61/5/1839.full.pdf>
- Dávila-Medina MD, Gallegos-Morales G, Hernández-Castillo FD, Ochoa-Fuente YM y Flores-Olivas A. 2013. Actinomicetos antagonísticos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(8): 1187-1196. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4n8/v4n8a6.pdf>
- Eskalen A, Stouthamer R, Lynch SC, Rugman-Jones PF, Twizeyimana M, Gonzalez A, and Thibault T. 2013. Host range of *Fusarium dieback* and its ambrosia beetle (Coleoptera: Scolytinae) vector in southern California. *Plant Disease* 97(7): 938-951. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1026-RE>
- Freeman S, Sharon M, Dori-Bachash M, Maymon M, Beausoy E, Maoz Y, Margalit O, Protasov A, and Mendel Z. 2016. Symbiotic association of three fungal species throughout the life cycle of the ambrosia beetle *Euwallacea* nr. *forficatus*. *Symbiosis* 68(1-3): 115-128. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0356-9>
- García-Ávila CDJ, Trujillo-Arriaga FJ, López-Buenfil JA, González-Gómez R, Carrillo D, Cruz LF, Ruiz-Galván I, Quezada-Salinas A and Acevedo-Reyes N. 2016. First report of *Euwallacea* nr. *forficatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Mexico. *Florida Entomologist* 99(3): 555-557. <https://doi.org/10.1653/024.099.0335>
- Gajera HP and Vakharia DN. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2010.04.005>
- Harrington TC, Fraedrich SW and Aghayeva DN. 2008. *Raffaelea lauricola*, a new ambrosia beetle symbiont and pathogen on the Lauraceae. *Mycotaxon* 104:399-404. [https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/ja/ja\\_harrington008.pdf](https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/ja/ja_harrington008.pdf)
- Hernández-Castillo FD, Berlanga-Padilla AM, Gallegos-Morales G, Cepeda-Siller M, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN y Castillo RF. 2011. *In vitro* antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotium cepivorum*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (3): 410-

417. <https://pdfs.semanticscholar.org/4677/cd523afb-c6b90f4cbe36ed0da94e4b7f5493.pdf>
- Hughes MA, Martini X, Kuhns E, Colee J, Mafra-Neto A, Ste-linski LL, and Smith JA. 2017. Evaluation of repellents for the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*, vector of the laurel wilt pathogen. *Journal of Applied Entomology* 141(8): 653-664. <https://doi.org/10.1111/jen.12387>
- Koontz J and Marcy J. 2003. Formation of natamycin: cyclo-dextrin inclusion complexes and their characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 7106-7110. <https://doi.org/10.1021/jf030332y>
- Korsten L, De-Villiers EE, Wehner RC and Kotzet JM. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81: 455-459. <https://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.5.455>
- Macías-Macías A. 2011. México en el mercado internacional de aguacate. *Revista de Ciencias Sociales*. 17(3): 517-532. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28022767011>
- Pérez-Corral D, García-González N, Gallegos-Morales G, Ruiz-Cisneros M, Berlanga-Reyes D and Rios-Velasco C. 2015. Isolation of actinomycetes associated to apple trees rhizosphere antagonistic to *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(7): 1629-1638. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Pridham TG, Hesseltine CW and Benedict RG. 1958. A guide for the classification of Streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections. *Applied Microbiology* 6(1): 52-79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057356/pdf/applmicro00315-0061.pdf>
- Rios-Velasco C, Caro CJ, Berlanga RD, Ruiz CM, Ornelas PJ, Salas MM, Villalobos PE and Guerrero PV. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84-99. <https://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Ruiz-Cisneros M, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes D, Ornelas-Paz J, Acosta-Muñiz C, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores P and Pérez-Corral DA. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3532017/RMF1704-3.pdf>
- Shirling EB and Gottlieb D. 1966. Method for characterization of Streptomycetes species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 313-340. doi: 10.1099/00207713-16-3-313.
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species: CRC press. 426 p.