

# Biocontrol of damping-off of zucchini squash seedlings with *Bacillus subtilis* QST 713

## Biocontrol del ahogamiento de plántulas de calabacita con *Bacillus subtilis* QST 713

**Alma Rosa Solano-Báez**, Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur No. 1103, Barrio de Santiago, Puebla, Puebla, CP 72410, México; **Santos Gerardo Leyva-Mir**, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; **Rosalía Núñez-Pastrana**, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Camino Peñuela-Amatlán s/n, Amatlán de los Reyes, Veracruz, CP 94945, México; **Andrés Quezada-Salinas**, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Km 37.5 Carretera Federal México-Pachuca Calle Centenario, Tecámac de Felipe de Villanueva, Estado de México, CP 55740, México; **Guillermo Márquez-Licona\***, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, Calle CeProBi No. 8, Colonia San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México.

\*Autor para correspondencia: gmarquezl@ipn.mx

Recibido: 06 de Enero, 2021.

Aceptado: 13 de Febrero, 2021.

Solano-Báez AR, Leyva-Mir SG, Núñez-Pastrana R, Quezada-Salinas A and Márquez-Licona G. 2021. Biocontrol of damping-off of zucchini squash seedlings with *Bacillus subtilis* QST 713. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 302-313.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-2>

Primera publicación DOI: 09 de Marzo, 2021.

First DOI publication: March 09, 2021.

**Resumen.** *Bacillus subtilis* presenta actividad antagónica contra fitopatógenos. En el presente estudio, se identificaron los hongos asociados al ahogamiento en plántulas de calabacita y se evaluó la efectividad de la cepa QST 713 de *B. subtilis* ante la infección combinada de los hongos aislados. Los

**Abstract.** *Bacillus subtilis* exhibits antagonistic activity against plant pathogens. In the present study, the fungi associated with damping off in zucchini squash seedlings were identified and the efficacy of *B. subtilis* strain QST 713 was evaluated against the combined infection of the isolated fungi. The pathogens were isolated from zucchini squash seedlings with symptoms of damping off. Seedlings of zucchini squash var. Gray zucchini were inoculated with propagules of three pathogens at a concentration of  $4 \times 10^5$  CFU of each pathogen. The effectiveness of *B. subtilis* ( $2, 4$  y  $6 \times 10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) was evaluated and compared with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive and curative). The incidence was assessed at three, six, nine and 12 days (dai). Three fungi out of 100 isolates were

patógenos se aislaron de plántulas de calabacita con síntomas de ahogamiento. Se inocularon plántulas de calabacita var. Grey zucchini con propágulos de tres patógenos a una concentración de  $4 \times 10^5$  UFC de cada patógeno. Se evaluó la efectividad de *B. subtilis* (2, 4 y  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) y se comparó con metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventiva y curativa). La incidencia se evaluó a los tres, seis, nueve y 12 días (ddi). Se aislaron e identificaron tres hongos de 100 aislamientos: *Phytophthora capsici* (62%), *Rhizoctonia solani* (26%) y *Fusarium oxysporum* (12%). Se observó la eficiencia de *B. subtilis*, con una reducción en la incidencia de la enfermedad conforme se incrementó la concentración. Doce días después de la inoculación, la incidencia del ahogamiento en los tratamientos con *B. subtilis* varió de 18.3 a 41%. El tratamiento de *B. subtilis* ( $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) fue estadísticamente igual a metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo). La cepa QST 713 de *B. subtilis* controló un 81.7% el ahogamiento de plántulas de calabacita, aplicada de manera preventiva a una concentración de  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** *Cucurbita pepo*, plántulas, metil tiofanato, propamocarb clorhidrato.

La calabacita (*Cucurbita pepo*) es una de las principales especies de cucurbitáceas (Zitter *et al.*, 2004). La producción de calabacita está limitada por agentes bióticos y abióticos durante todo su ciclo de cultivo, siendo la etapa de plántula una de las más críticas. Existen numerosos patógenos que pueden afectar las semillas y plántulas, causando ahogamiento en preemergencia o postemergencia. Los agentes causales más comunes del ahogamiento de plántulas en cucurbitáceas son: *Fusarium oxysporum* (Vakalounakis y Chalkias, 2004), *Phytophthora capsici* (Hausbeck y Lamour, 2004), *Rhizoctonia*

isolated and identified: *Phytophthora capsici* (62%), *Rhizoctonia solani* (26%) and *Fusarium oxysporum* (12%). The efficiency of *B. subtilis* was observed, with a reduction in the incidence of the disease as the concentration was increased. Twelve days after inoculation, the incidence of damping off in *B. subtilis* treatments ranged from 18.3 to 41%. The *B. subtilis* treatment ( $6 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>) was statistically equal to methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative). The strain QST 713 of *B. subtilis* controlled 81.7% the damping off of zucchini squash seedlings, applied preventively at a concentration of  $6 \times 10^7$  CFU mL<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Cucurbita pepo*, seedlings, thiophanate-methyl, propamocarb hydrochloride.

Zucchini squash (*Cucurbita pepo*) is one of the main cucurbitaceae species (Zitter *et al.*, 2004). Its production is limited by biotic and abiotic agents during the whole cropping cycle, being the seedling stage one of the most critical. There are numerous pathogens that affect seed and seedlings and cause pre-emergence or post-emergence damping off. The most common causal agents of seedlings damping off in cucurbitaceae are *Fusarium oxysporum* (Vakalounakis and Chalkias, 2004), *Phytophthora capsici* (Hausbeck and Lamour, 2004), *Rhizoctonia solani* (Scheuerell *et al.*, 2005) and *Pythium* spp. (Deadman *et al.*, 2002; Scheuerell *et al.*, 2005). In the past two decades, the use of synthetic pesticides has been considerably reduced because of the development of new control strategies such as biopesticides (Ongena and Jacques, 2007). One of the species most used as bioplagueicide is *Bacillus subtilis*, because it produces antibiotics, lipoproteins and hydrolytic enzymes which confer antifungal activity, making it an excellent biological control agent of phytopathogens. Specifically,

*solani* (Scheuerell *et al.*, 2005) y *Pythium* spp. (Deadman *et al.*, 2002; Scheuerell *et al.*, 2005). En las dos últimas décadas, el uso de plaguicidas sintéticos ha disminuido considerablemente debido al desarrollo de nuevas estrategias de control como los bioplaguicidas (Ongena y Jacques, 2007). Una de las especies más usadas como bioplaguicida es *Bacillus subtilis*, debido a que ésta produce antibióticos, lipoproteínas y enzimas hidrolíticas, que le confieren actividad antifúngica, convirtiéndola en un excelente agente de control biológico de fitopatógenos (Ongena y Jacques, 2007). De forma específica, se ha reportado su actividad sobre organismos que inducen ahogamiento de plántulas, y sus efectos benéficos sobre las plántulas tratadas (Cavaglieri *et al.*, 2005; Sharma y Sharma, 2008). *B. subtilis* produce tres familias de polipéptidos cíclicos (surfactinas, iturinas y fengicinas) relacionadas con su actividad antagónica contra bacterias, hongos y oomicetes. Estas lipoproteínas también están asociadas a una mayor capacidad de colonización de las raíces vegetales de la cepa bacteriana que las produce, e intervienen en la estimulación de la respuesta de defensa de la planta (Ongena y Jacques, 2007; Villareal-Delgado *et al.*, 2017). Además de los polipéptidos cíclicos, *B. subtilis* produce compuestos antimicrobiales, que le confieren una mayor capacidad para el control de fitopatógenos (Hamdache *et al.*, 2011; Wise *et al.*, 2012). Por lo anterior, *B. subtilis* es una alternativa promisoriosa para el control biológico de fitopatógenos (Falardeau *et al.*, 2013; Khedher *et al.*, 2015). Hasta el momento, los datos publicados sobre la efectividad de la cepa QST 713 de *B. subtilis* para el control combinado de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* son escasos. Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo identificar morfológicamente a los agentes causales asociados al ahogamiento en plántulas de calabacita y determinar la efectividad de *B. subtilis* cepa QST 713 sobre la incidencia de la enfermedad

its activity has been reported in organisms which induce seedling damping off, and its beneficial effects on treated seedlings (Cavaglieri *et al.*, 2005; Sharma and Sharma, 2008). *B. subtilis* produces three families of cyclic polypeptides (surfactins, iturines and fengycins) involved in its antagonistic activity against bacteria, fungi, and oomycetes. These lipoproteins are also associated with a greater capacity to colonize the plant roots of the bacterial strain that produces them and are involved in the stimulation of the plant's defense response (Ongena and Jacques, 2007; Villareal-Delgado *et al.*, 2017). In addition to cyclic polypeptides, *B. subtilis* produces antimicrobial compounds which increase its capacity to control phytopathogens (Hamdache *et al.*, 2011; Wise *et al.*, 2012). Based on this, *B. subtilis* is a promising alternative for the biological control of phytopathogens (Falardeau *et al.*, 2013; Khedher *et al.*, 2015). So far, the data published on the effectiveness of *B. subtilis* strain QST 713 for the combined control of *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* are scarce. Therefore, the objective of this research was to morphologically identify the causal agents associated with damping off in zucchini squash seedlings and determine the effectiveness of *B. subtilis* strain QST 713 on the incidence of the disease produced by the combined inoculation of the isolated fungi.

During the 2019 spring-summer cycle, zucchini squash (*Cucurbita pepo*) seedlings with damping off symptoms were collected in Cuautla, Morelos. The fungi associated with the symptoms were isolated from root and stem cuts, as described by Ayala-Armenta *et al.* (2020). The morphological characterization was conducted under a compound microscope CX31RBSFA (Olympus®, Japan) at 40X, where 50 reproductive structures of each isolate were measured. The molecular identification was done based on specialized taxonomic keys (Leslie and Summerell, 2006; Sneh *et al.*, 1991; Erwin and

producida por la inoculación combinada de los hongos aislados.

En el ciclo primavera-verano 2019, se colectaron plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) con síntomas de ahogamiento en Cuautla, Morelos. El aislamiento de los hongos asociados a los síntomas se realizó a partir de cortes de raíces y tallos, de acuerdo con lo descrito por Ayala-Armenta *et al.* (2020). La caracterización morfológica se realizó a 40X en un microscopio compuesto CX31RBSFA (Olympus®, Japón), donde se midieron 50 estructuras reproductivas de cada aislado. La identificación se realizó con base en claves taxonómicas especializadas (Leslie y Summerell, 2006; Sneh *et al.*, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996). Para corroborar la patogenicidad de los aislados se realizaron los Postulados de Koch usando plántulas sanas de calabacita. La prueba de patogenicidad se realizó dos veces seleccionando el aislamiento más virulento de cada especie.

Para la evaluación de *B. subtilis* contra los hongos aislados, se usaron semillas de calabacita var. Grey zucchini. El tratamiento fungicida presente en las semillas se eliminó de acuerdo con lo descrito por Márquez-Licona *et al.* (2018). Siete días después de la siembra, las plántulas emergidas se trasplantaron a vasos de poliuretano de 500 mL, que contenían sustrato estéril a base de Peat Moss y agrolita (75:25 v/v). Los tratamientos evaluados consistieron en tres concentraciones de la cepa QST 713 de *B. subtilis* (Serenade ASO®) (2, 4 y  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) y metil tiofanato + propamocarb clorhidrato aplicado de manera preventiva y curativa (Cuadro 1). Se determinó la incidencia del ahogamiento de plántulas de calabacita causado por la infección combinada de los hongos aislados y en condiciones de invernadero (24 °C y 70% HR). La evaluación de los tratamientos se realizó por duplicado. La viabilidad del producto comercial se determinó sembrando una alícuota del mismo en cua-

Ribeiro, 1996). To confirm the pathogenicity of the isolates, the Koch's postulates were followed using healthy squash seedlings. The pathogenicity test was conducted twice selecting the most virulent isolate of each species.

To evaluate *B. subtilis* against the isolated fungi, seeds of zucchini squash Grey var. were used. The fungicide treatment on the seeds was eliminated as described by Márquez-Licona *et al.* (2018). Seven days after planting, the emerging seedlings were transplanted to 500 mL polyurethane cups containing Peat Moss and agrolite sterile substrate (75:25 v/v). The evaluated treatments consisted of three concentrations of *B. subtilis* QST 713 strain (Serenade ASO®) (2, 4 and  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride, which were applied preventively and curatively (Table 1). The incidence of damping off caused by the combined infection of the isolated fungi and under greenhouse conditions was determined using zucchini squash seedlings (24 °C and 70% HR). The treatments were evaluated in duplicate. The viability of the commercial product was determined by placing an aliquot of the product in four Petri dishes containing PDA medium. The Petri dishes were incubated in darkness at 36 °C for 48 h. The viability evaluation was made in duplicate. Inoculum was increased for each pathogen in specific culture mediums (SNA, V8 Agar and PDA). The inoculum load of each of the pathogens applied per plant was adjusted at a concentration of  $4 \times 10^5$  UFC using a hemocytometer (Marienfeld®). The inoculation of the pathogens was made three days after transplanting. The biological product based on *B. subtilis* was applied twice to zucchini squash seedlings, the first to the transplanted seedlings, and the second six days after transplanting; in both cases, 5 mL of the suspension were applied at the seedlings neck. The preventive chemical treatment was applied when the seedlings were

**Cuadro 1. Tratamientos evaluados para el control del ahogamiento de plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) bajo condiciones de invernadero.**  
**Table 1. Evaluation of treatments to control damping off in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) under greenhouse conditions.**

Tratamiento	Concentración	Inóculo <sup>z</sup>
Testigo inoculado	Sin tratamiento	Inoculado
<i>B. subtilis</i> <sup>y</sup>	2×10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Inoculado
<i>B. subtilis</i> <sup>y</sup>	4×10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Inoculado
<i>B. subtilis</i> <sup>y</sup>	6×10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	Inoculado
Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (P)	105 ppm + 868 ppm	Inoculado
Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (C)	105 ppm + 868 ppm	Inoculado
Testigo absoluto	Sin tratamiento	Sin inoculación

<sup>y</sup> Cepa QST 713 = Serenade ASO®. <sup>z</sup> *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* aplicando 4×10<sup>5</sup> UFC de cada uno por planta. P: tratamiento preventivo. C: tratamiento curativo. / <sup>y</sup> Strain QST 713 = Serenade ASO®. <sup>z</sup> *F. oxysporum* + *P. capsici* + *R. solani* applying 4×10<sup>5</sup> UFC of each per plant. P: preventive treatment. C: curative treatment.

tro cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas se incubaron en oscuridad a 36 °C por 48 h. La evaluación de la viabilidad se realizó por duplicado. El inóculo se incrementó en medios de cultivo específicos para cada patógeno (SNA, V8 Agar y PDA). La carga de inóculo de cada patógeno aplicado por planta, se ajustó a una concentración de 4×10<sup>5</sup> UFC usando un hemacitómetro (Marienfeld®). La inoculación de los patógenos se realizó tres días después del trasplante. El producto biológico a base de *B. subtilis* se aplicó dos veces en las plántulas de calabacita, la primera al trasplante y la segunda seis días después del trasplante, depositando en ambos casos 5 mL de la suspensión al cuello de la plántula. El tratamiento químico preventivo se aplicó al momento del trasplante y el curativo a 72 h después de la inoculación de los patógenos depositando 5 mL de la solución al cuello de la plántula. Para determinar la efectividad de los tratamientos sobre la enfermedad, la incidencia del ahogamiento en las plántulas de calabacita se registró cada 24 h, a partir del momento de la inoculación de los patógenos. El análisis estadístico incluyó las evaluaciones a los tres, seis, nueve y 12 días. La unidad experimental constó de 100 plántulas, los datos

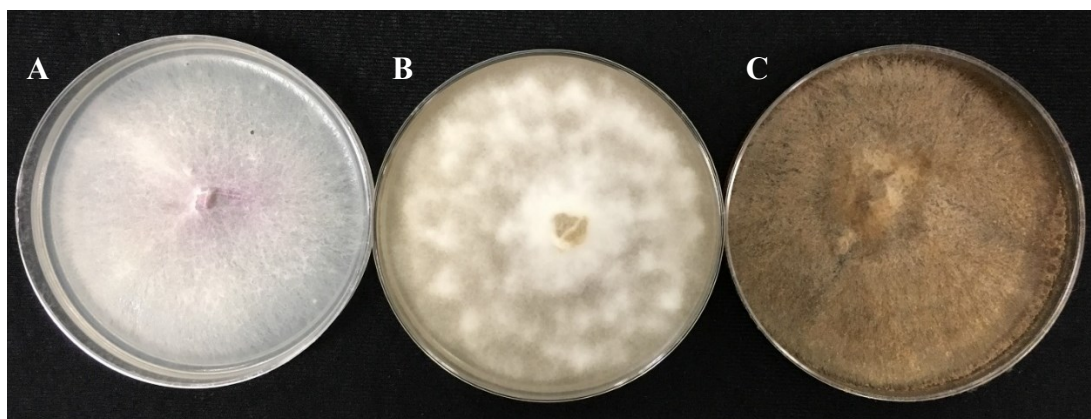
transplanted, and the curative treatment 72 h after the pathogens were inoculated, for which 5 mL of the solution were applied to the seedlings neck. To determine the effectiveness of the treatments on the disease, the damping off incidence in the seedlings was measured every 24 h, starting at the time when the pathogens were inoculated. The statistical analysis included evaluations at three, six, nine and 12 days. The experimental unit consisted of 100 seedlings, and the obtained data were analyzed using a randomized complete block design with four replications per treatment. The data were subjected to an analysis of variance and comparison of multiple means using the Tukey's honest significant difference method at a significance level of 5%, and SAS for Windows v. 9.4 (SAS® Systems). The phytotoxicity evaluation of the treatments was made using the percentage scale proposed by the European Weed Research Society (<https://www.ewrs.org/>). To confirm the presence of the pathogens that were inoculated in the diseased plants, re-isolations were made in PDA culture medium. At the end of the experiment, the surviving plants were kept under observation for another 14 days.



obtenidos se analizaron con base al modelo de un diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias mediante el método de la diferencia significativa honesta de Tukey, a un nivel de significancia del 5%, usando el software estadístico SAS® Systems for Windows V 9.4. La evaluación de la fitotoxicidad de los tratamientos se realizó usando la escala porcentual propuesta por la European Weed Research Society (<https://www.ewrs.org/>). Con el propósito de corroborar la presencia de los patógenos inoculados en las plantas enfermas, se hicieron reaislamientos en medio de cultivo PDA. Al final del experimento, las plantas que sobrevivieron se mantuvieron en observación por 14 días más.

Se obtuvieron 100 aislamientos a partir de las plántulas de calabacita con síntomas de ahogamiento recolectadas en Cuautla, Morelos, donde se identificaron a *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Figura 1) en 62, 26 y 12%, respectivamente. Las pruebas de patogenicidad demostraron que los organismos aislados eran patogénicos. Las plantas inoculadas con *P.*

One-hundred isolates were obtained from zucchini squash seedlings with damping off symptoms collected in Cuautla, Morelos, where *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* (Figure 1) were identified in 62, 26 and 12%, respectively. The pathogenicity tests confirmed that the isolated organisms were pathogenic. The plants inoculated with *P. capsici* showed damping off symptoms four days after inoculation, whereas the plants which were independently inoculated with *F. oxysporum* and *R. solani* showed disease symptoms six days after inoculation. In this research, the symptoms occurred earlier than those reported by Chehri *et al.* (2010), who observed damping off symptoms seven days after inoculating *P. capsici* and *F. oxysporum* in cucurbitaceae. SNA, PDA and V8-Agar juice culture mediums increased the amount of inoculum of *F. oxysporum*, *R. solani* and *P. capsici*, respectively. The *B. subtilis* bacterium strain QST 713 (Serenade ASO®) colonized the Petri dish 48 h after the strain was sown and incubated at 36 °C, thus confirming the viability of the commercial product. The first damping off



**Figura 1.** Colonias de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo SNA (A), *Phytophthora capsici* en V8 Agar (B) y *Rhizoctonia solani* en medio PDA (C) aisladas de plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) con síntomas de ahogamiento. Aspecto de las colonias 12 días después de la siembra en medios selectivos.

**Figure 1.** *Fusarium oxysporum* colonies in SNA culture medium (A), *Phytophthora capsici* in V8 Agar (B) and *Rhizoctonia solani* in PDA medium (C) isolated from zucchini squash seedlings (*Cucurbita pepo*) with damping off symptoms. Appearance of the colonies 12 days after sowing in selective media.

*capsici* mostraron síntomas de ahogamiento cuatro días después de la inoculación, mientras que las plantas inoculadas de forma independiente con *F. oxysporum* y *R. solani* desarrollaron síntomas de la enfermedad a los seis días después de la inoculación. En la presente investigación, los síntomas se presentaron antes con respecto a lo observado por Chehri *et al.* (2010) quienes observaron síntomas de ahogamiento siete días después de la inoculación de *P. capsici* y *F. oxysporum* en cucurbitáceas. Los medios de cultivo SNA, PDA y Jugo V8-Agar permitieron el incremento de inóculo de *F. oxysporum*, *R. solani* y *P. capsici* respectivamente. La bacteria *B. subtilis* cepa QST 713 (Serenade ASO®) colonizó la caja de Petri 48 h después de la siembra incubándola a 36 °C, demostrándose así la viabilidad del producto comercial. Los síntomas iniciales de ahogamiento en las plantas de calabacita se observaron a las 72 h después de la inoculación. El síndrome concuerda con lo descrito por Koike *et al.* (2007).

La incidencia de la enfermedad presentó una relación directamente proporcional respecto al tiempo transcurrido después de la inoculación. A los 12 días después de la inoculación de los patógenos en las plantas testigo alcanzaron un 100% de incidencia de la enfermedad, mientras que las plantas del testigo absoluto permanecieron sanas. La incidencia promedio de la enfermedad en los tratamientos evaluados se presenta en el Cuadro 2. A los tres días después de la inoculación (ddi) (primera evaluación), el testigo inoculado con el tratamiento metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) y los tratamientos de *B. subtilis*  $2 \times 10^7$  y  $4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> presentaron una incidencia de la enfermedad de 2 y 2.5% respectivamente, siendo estadísticamente diferentes respecto al resto de los tratamientos evaluados, los cuales se mantuvieron sanos. En la segunda evaluación (seis ddi), el testigo inoculado alcanzó una incidencia promedio de 60%, mientras

symptoms in zucchini squash plants appeared 72 h after inoculation. The syndrome coincides with the result described by Koike *et al.* (2007).

The disease incidence was directly proportional to the time elapsed after inoculation. Twelve days after the pathogens were inoculated into the control plants, the disease incidence reached 100%, whereas the absolute control plants remained healthy. The average disease incidence in the evaluated treatments is shown in Table 2. Three days after inoculation (dai) (first evaluation), the control inoculated with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) and the treatments based on *B. subtilis*  $2 \times 10^7$  and  $4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> showed a disease incidence of 2 and 2.5%, respectively, being statistically different to the rest of the evaluated treatments, which remained healthy. In the second evaluation (six dai), the inoculated control reached 60% average incidence, while the treatments based on *B. subtilis*  $2 \times 10^7$  and  $4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> showed 31.8 and 33.8% disease incidence, respectively. The treatments based on *B. subtilis*  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative) were statistically equal, while the treatment with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) and the absolute control were statistically equal, with 0% disease incidence. In the third evaluation (nine dai), the previous tendency was continuous and there was only an increase in the percent of the disease incidence. The inoculated control reached 75% average incidence, while the treatments based on *B. subtilis*  $2 \times 10^7$  and  $4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> showed 33.8 and 38.8% disease incidence, respectively. The treatments based on *B. subtilis*  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative) were statistically equal, while the treatment with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) and the absolute control were also statistically equal, with 0% disease

**Cuadro 2. Eficiencia de *B. subtilis* en la incidencia del ahogamiento (*F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*) de plántulas de calabacita (*Cucurbita pepo*) bajo condiciones de invernadero.****Table 2. Effectiveness of *B. subtilis* in damping off incidence (*F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani*) in zucchini squash seedlings (*Cucurbita pepo*) under greenhouse conditions.**

Tratamiento	Incidencia promedio de plántulas de calabacita (%)			
	3 ddi	6 ddi	9 ddi	12 ddi
Testigo inoculado	2.5a	60.0a	75.0a	100.0a
<i>B. subtilis</i> 2×10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	2.5a	33.8b	38.8b	41.3b
<i>B. subtilis</i> 4×10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	2.0a	31.3b	33.8b	38.8c
<i>B. subtilis</i> 6×10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	0.0b	14.8c	16.8c	18.3d
Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (P)	0.0b	0.0d	0.0d	0.0e
Metil tiofanato + Propamocarb clorhidrato (C)	2.5a	12.0c	14.8c	16.3d
Testigo absoluto	0.0b	0.0d	0.0d	0.0e
DMS (5%):	1.3	5.5	5.8	2.37
CV:	43.5	10.9	9.8	3.31

Los valores medios seguidos por las mismas letras dentro de la misma columna son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.05$ ), según el método de la diferencia significativa honesta de Tukey. ddi: días después de la inoculación. P: tratamiento preventivo. C: tratamiento curativo. / The intermediate values followed by the same letters in the same column are statistically equal ( $P \leq 0.05$ ), according to Tukey's honest significant difference method. dai: days after inoculation. P: preventive treatment. C: curative treatment.

que los tratamientos a base de *B. subtilis* 2×10<sup>7</sup> y 4×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> presentaron una incidencia de la enfermedad de 31.8 y 33.8% correspondientemente. Los tratamientos de *B. subtilis* 6×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo) fueron estadísticamente iguales, mientras que el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) y el testigo absoluto fueron estadísticamente iguales, con 0% de incidencia de la enfermedad. En la tercera evaluación (nueve ddi), la tendencia anterior se mantuvo solo con un incremento en los porcentajes de incidencia de la enfermedad. El testigo inoculado alcanzó una incidencia promedio de 75%, mientras que los tratamientos de *B. subtilis* 2×10<sup>7</sup> y 4×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> presentaron una incidencia de la enfermedad de 33.8 y 38.8%, respectivamente. Los tratamientos de *B. subtilis* 6×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo) fueron estadísticamente iguales, mien-

incidence. Finally, in the fourth evaluation (12 dai), the inoculated control reached 100% average incidence, while the treatment based on *B. subtilis* 2×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> reached 41.3% incidence, and the treatment based on *B. subtilis* 4×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> reached 38.8% incidence; however, both treatments (2×10<sup>7</sup> and 4×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) were statistically equal. In the treatments based on *B. subtilis* 6×10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> and methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (curative) the disease incidence increased 2% compared to the percent obtained in the third evaluation, being statistically equal. Finally, the plants treated with methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride (preventive) remained healthy, this is, with 0% disease incidence.

The results of the effectiveness of *B. subtilis* obtained in this study agree with the results reported by other researchers. It has been consistently demonstrated that *B. subtilis* is effective to



tras el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) y el testigo absoluto también fueron estadísticamente iguales, con 0% de incidencia de la enfermedad. Finalmente, en la cuarta evaluación (12 ddi), el testigo inoculado alcanzó una incidencia promedio de 100%, mientras que el tratamiento *B. subtilis*  $2 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> la incidencia se incrementó a 41.3% y en el tratamiento *B. subtilis*  $4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> la incidencia se incrementó a 38.8%; sin embargo, ambos tratamientos ( $2 \times 10^7$  y  $4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) fueron estadísticamente iguales. En los tratamientos *B. subtilis*  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> y el metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (curativo) presentaron un incremento del 2% en la incidencia de la enfermedad respecto a lo registrado en la tercera evaluación siendo estadísticamente iguales. Por último, las plantas tratadas con metil tiofanato + propamocarb clorhidrato (preventivo) se mantuvieron sanas, es decir, con 0% de incidencia de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en la presente investigación sobre la efectividad de *B. subtilis* corresponden a lo reportado por otros investigadores. Se ha demostrado consistentemente que *B. subtilis* es eficiente para el control de *F. oxysporum* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Fusarium* sp. (Illa *et al.*, 2020), *P. capsici* (Khalaf y Raizada, 2018) y *R. solani* (Brewer y Larkin, 2005) en diferentes hospedantes, incluyendo cucurbitáceas. De igual forma, los resultados obtenidos con la aplicación de metil tiofanato, concuerdan con los resultados de investigaciones previas que documentan la efectividad de este fungicida metil benzimidazol carbamato para el control de *F. oxysporum* en varios hospedantes (Nel *et al.*, 2007; Tarekegn *et al.*, 2007). Asimismo, el metil tiofanato reduce efectivamente la infección por *R. solani* en diferentes hospedantes (Hancock, 1993; Kumar *et al.*, 2003; Olaya *et al.*, 1994). El propamocarb clorhidrato es un ingrediente activo ampliamente usado para el control de oomicetes,

control *F. oxysporum* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Fusarium* sp. (Illa *et al.*, 2020), *P. capsici* (Khalaf and Raizada, 2018) and *R. solani* (Brewer and Larkin, 2005) in different hosts, including cucurbitaceae. Similarly, the results obtained using methyl thiophanate are consistent with the results of previous studies that document the effectiveness of methyl benzimidazole carbamate to control *F. oxysporum* in several hosts (Nel *et al.*, 2007; Tarekegn *et al.*, 2007). Methyl thiophanate is also effective to reduce *R. solani* infection in different hosts (Hancock, 1993; Kumar *et al.*, 2003; Olaya *et al.*, 1994). Propamocarb hydrochloride is a widely used active ingredient for the control of oomycetes, including *Phytophthora* spp. in cucurbitaceae (Deadman *et al.*, 2002).

After the 12 days of the experiment, no increase in the percentage of diseased plants in the treatments was observed. None of the evaluated treatments caused phytotoxicity to zucchini squash seedlings. In the re-isolation of the phytopathogenic fungi which were recovered from the inoculated control, the frequency obtained was of 50, 35 and 15% for *P. capsici*, *R. solani* and *F. oxysporum*; these data coincided with the frequency of seedlings collected in the field. This suggests that the dumping off symptoms observed in the combined inoculation were mainly caused by *P. capsici* infection. The first symptoms, caused by the combined inoculation, appeared in a shorter period than that observed when the pathogens were individually inoculated (Fernández-Herrera *et al.*, 2007), thus indicating that when *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani* were combined, the inoculation was more aggressive, because the incubation period was of only 72 h. In this study, a higher radical development of plants treated with *B. subtilis* was qualitatively observed. Although none of the treatments based on *B. subtilis* completely protected the zucchini squash seedlings from the combined infection of *F.*

incluyendo *Phytophthora* spp. en cucurbitáceas (Deadman *et al.*, 2002).

Posterior a los 12 días de la evaluación del experimento, no se observó incremento en el porcentaje de plantas enfermas en los tratamientos. Ninguno de los tratamientos evaluados causó fitotoxicidad en las plántulas de calabacita. En el reaislamiento de hongos fitopatógenos recuperados de las plántulas del testigo inoculado se obtuvo una frecuencia de 50, 35 y 15% para *P. capsici*, *R. solani* y *F. oxysporum*, datos que coincidieron en frecuencia de las plántulas colectadas en campo. Lo anterior sugiere que los síntomas de ahogamiento observados en la inoculación combinada se deben principalmente a la infección por *P. capsici*. Los síntomas iniciales, causados por la inoculación combinada, se presentaron en un periodo más corto que lo observado en la inoculación individual de los patógenos (Fernández-Herrera *et al.*, 2007), lo que indica que la inoculación conjunta de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* fue más agresiva, presentando un periodo de incubación de solo 72 h. En el presente estudio, se observó de manera cualitativa un mayor desarrollo radical de las plantas tratadas con *B. subtilis*. Aun cuando ninguno de los tratamientos a base de *B. subtilis* protegieron completamente a las plántulas de calabacita de la infección conjunta de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*, se observó la siguiente tendencia: a mayor concentración de la bacteria, se registró una menor incidencia de la enfermedad. El tratamiento con *B. subtilis* a  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, fue estadísticamente igual que el tratamiento químico curativo, lo que demuestra la factibilidad de su uso en el manejo biológico de la enfermedad. En el caso del tratamiento químico preventivo fue estadísticamente igual que el testigo absoluto, corroborándose así la efectividad del control químico. No obstante, dentro de la tendencia actual en la reducción del uso de moléculas sintéticas en la producción agrícola, el uso preventivo de productos biológicos es

*oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani*, the following tendency was observed: the higher the concentration of bacterium, the lower the disease incidence. The treatment based on *B. subtilis* at  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> was statistically equal to the curative chemical treatment, which demonstrates its potential for the biological management of the disease. The preventive chemical treatment was statistically equal to the absolute control, thereby demonstrating the effectiveness of the chemical control. However, as part of the current trend in reducing the use of synthetic molecules in agricultural production, the preventive use of biological products is the ecologically viable response to manage the disease. The use of higher concentrations of *B. subtilis* is suggested in further studies.

The products evaluated helped consistently to reduce the incidence of zucchini squash seedlings death. The biological product based on *B. subtilis* at a concentration of  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> protected more than 80% of the zucchini squash seedlings which were inoculated with *F. oxysporum*, *P. capsici* and *R. solani*; its effectiveness was statistically equal to that of the curative treatment based on methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride. The preventive treatment based on methyl thiophanate + propamocarb hydrochloride protected 100% of the seedlings from the inoculation of the three pathogens.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

la respuesta ecológicamente viable para el manejo de la enfermedad. En estudios posteriores se sugiere evaluar concentraciones más altas de *B. subtilis*.

Los productos evaluados contribuyeron consistentemente a disminuir la incidencia de la muerte de plántulas de calabacita. El producto biológico

a base de *B. subtilis* a una concentración de  $6 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> protegió más del 80% de las plántulas de calabacita inoculadas con *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*, teniendo una efectividad estadísticamente igual al tratamiento curativo de metil tiofanato + propamocarb clorhidrato. Mientras que el tratamiento preventivo de metil tiofanato + propamocarb clorhidrato protegió al 100% de las plántulas de la inoculación de los tres patógenos.

## LITERATURA CITADA

- Ayala-Armenta QA, Tovar-Pedraza JM, Apodaca-Sánchez MA, Correia KC, Saucedo-Acosta CP, Camacho-Tapia M and Beltrán-Peña H. 2020. Phylogeny and pathogenicity of soilborne fungi associated with wilt disease complex of tomatillo (*Physalis ixocarpa*) in northern Sinaloa, Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 157: 733-749. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02030-9>
- Brewer MT and Larkin RP. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* 24(11): 939-950. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.012>
- Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez MI, Chulze S and Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156(5-6): 748-754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- Chehri K, Abbasi S, Reddy KRN and Salleh B. 2010. Occurrence and pathogenicity of various pathogenic fungi on cucurbits from Kermanshah province, Iran. *African Journal of Microbiology Research* 4(12): 1215-1223. <https://doi.org/10.5897/AJMR.9000532>
- Deadman ML, Al-Saadi AM, Al-Mahmuli I, Al-Maqbali YM, Al-Subhi R, Al-Kiyoomi K, Al-Hasani H and Thacker JRM. 2002. Management of *Pythium aphanidermatum* in greenhouse cucumber production in the Sultanate of Oman. Pp. 171-176. In: The BCPC Conference: Pest and diseases. Vol. 2. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK. 1042 p
- Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathology Society, MN, USA. 562p.
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L and Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology* 39: 869-878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- Fernández-Herrera E, Acosta-Ramos M, Ponce-González F y Manuel-Pinto V. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. y *Rhizoctonia solani* Kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 35-42. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v25n1/v25n1a5.pdf>
- Hamdache A, Lamarti A, Aleu J and Collado IG. 2011. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *Journal of Natural Products* 74(4): 893-899. <https://doi.org/10.1021/np100853e>
- Hancock JG. 1993. Fungal rootlet colonization and forage yields of alfalfa in fungicide-treated field plots. *Plant Disease* 77: 601-608. <https://doi.org/10.1094/pd-77-0601>
- Hausbeck MK and Lamour KH. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88(12): 1292-1303. <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.12.1292>
- Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 119-131. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Khalaf EM and Raizada MN. 2018. Bacterial seed endophytes of domesticated cucurbits antagonize fungal and oomycete pathogens including powdery mildew. *Frontiers in Microbiology* 9: 42. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>
- Khedher SB, Kilani-Feki O, Dammak M, Jabnoun-Kharreddine H, Daami-Remadi M and Tounsi S. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies* 338(12): 784-792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2015.09.005>
- Koike ST, Gladders P and Paulus AO. 2007. *Vegetable diseases. A colour handbook*. Manson Publishing, London, UK, 448p. <https://www.crcpress.com/Vegetable-Diseases-A-Colour-Handbook/T-Koike-Gladders-Paulus/p/book/9781840760750>
- Kumar V, Haseeb A and Shukla PK. 2003. Effect of carbofuran, Topsin-M and neem cake on *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* infesting *Hyoscyamus niger*. *Current Nematology* 14: 1-4. <http://biovedjournal.org/Current%20Nematology%20journal.html>
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. 388p. <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- Márquez-Licona G, Leyva-Mir SG, De León C, Hernández-Vargas M, Téliz-Ortiz D, Kolařík M and Castillo-González F. 2018. Artificial inoculation of maize seeds with *Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*. *Maydica* 63(1): 1-8. <https://journals-crea.4science.it/index.php/maydica/article/view/1593>
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristobal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC and Pacheco-Aguilar JR. 2016. *Bacillus* spp. in the control of wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Mexican Journal of Phytopathology* 34(3): 208-222. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1>
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N and Viljoen A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection* 26(4): 697-705. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.06.008>
- Olaya G, Abawi GS and Barnard J. 1994. Response of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* to five fungicides

- and control of pocket rot of table beets with foliar sprays. *Plant Disease* 78: 1033–1037. <https://doi.org/10.1094/pd-78-1033>
- Ongena M and Jacques P. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16(3): 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Scheuerell SJ, Sullivan DM and Mahaffee WF. 2005. Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. *Phytopathology* 95(3): 306–315. <https://doi.org/10.1094/phyto-95-0306>
- Sharma N and Sharma S. 2008. Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. *Microbiological Research* 163: 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.011>
- Sneh B, Burpee L and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathology Society, MN, USA. 133p.
- Tarekegn G, Sakhujia PK, Swart WJ and Tamado T. 2007. Integrated management of groundnut root rot using seed quality and fungicide seed treatment. *International Journal of Pest Management* 53(1): 53–57. <https://doi.org/10.1080/09670870601058940>
- Vakalounakis DJ and Chalkias J. 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in soil. *Crop Protection* 23(9): 871–873. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.01.011>
- Villareal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI and De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology* 36(1): 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Wise C, Novitsky L, Tsopmo A and Avis TJ. 2012. Production and antimicrobial activity of 3-hydroxypropionaldehyde from *Bacillus subtilis* strain CU12. *Journal of Chemical Ecology*. 38: 1521–1527. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0219-2>
- Zitter T, Hopkins D y Thomas C. 2004. Plagas y enfermedades de las cucurbitáceas. American Phytopathological Society. Mundi-Prensa. Madrid, España. 88p.