

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS PRESENTES  
EN CULTIVO DE FRESA CONTRA CEPAS SILVESTRES DE *Fusarium spp.*

JOSELIN PEÑA CAMARGO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POPAYÁN-CAUCA  
2023

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS PRESENTES EN  
CULTIVO DE FRESA CONTRA CEPAS SILVESTRES DE *Fusarium spp.*

JOSELIN PEÑA CAMARGO

Trabajo de grado en la modalidad de trabajo de investigación, para optar por el título de  
ingeniero agroindustrial

Directores:

M.Sc. IVAN DARÍO OTERO RAMÍREZ  
PhD. JOSÉ LUIS HOYOS CONCHA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POPAYÁN-CAUCA  
2023

Nota de aceptación

Los directores y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del proyecto por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

---

JOSÉ LUIS HOYOS CONCHA Ph. D  
Director

---

IVAN DARÍO OTERO RAMÍREZ M.Sc.  
Director

---

RICARDO CAMACHO MUÑOZ M.Sc.  
Jurado

---

SANDRA MAGALLY SÁNCHEZ TRUJILLO M.Sc.  
Jurado

## CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN .....	10
2. ABSTRACT .....	12
3. INTRODUCCIÓN.....	14
4. OBJETIVOS .....	16
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
5. MARCO REFERENCIAL .....	17
5.1 Localización .....	17
5.2 MARCO TEÓRICO .....	17
5.2.1 Características del cultivo de fresa. ....	17
5.2.2 Enfermedades del cultivo de fresa.....	17
5.2.3 <i>Fusarium spp.</i> .....	21
5.2.4 Estrategia de control de enfermedades en cultivo de fresa.....	21
6. MARCO HISTÓRICO .....	25
7. METODOLOGÍA.....	27
7.1 IDENTIFICACIÓN DE <i>Fusarium spp.</i> PRESENTE EN SUELO Y RAÍZ DEL CULTIVO DE FRESA.....	27
7.1.1 Muestreo .....	27
7.1.2 Aislamiento de <i>Fusarium spp.</i> presente en suelo y raíz de cultivos de fresa.. ..	27
7.1.3 Purificación .....	28
7.1.4 Descripción macroscópica y microscópica de las colonias purificadas .....	28
7.1.5 Conservación.....	29
7.1.6 Caracterización molecular de <i>Fusarium spp.</i> .....	29
7.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS AISLADAS DEL SUELO Y RAÍZ DE CULTIVO DE FRESA SOBRE <i>Fusarium spp.</i> .....	31
7.2.1 Muestreo .....	31
7.2.2 Aislamiento de bacterias presentes en suelo y raíz de cultivos de fresa ....	31

7.2.3	Purificación de bacterias.....	32
7.2.4	Descripción macroscópica y microscópica de bacterias .....	32
7.2.5	Conservación de bacterias .....	32
7.2.6	Prueba de antagonismo por cultivo dual entre bacterias aisladas y <i>Fusarium spp.</i> .....	33
7.2.7	Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra <i>Fusarium spp.</i> .....	34
7.2.8	Efecto del pH sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra <i>Fusarium spp.</i> .....	34
7.2.9	Antagonismo por metabolitos volátiles.....	35
7.2.10	Antagonismo por metabolitos no volátiles.....	35
7.3	Caracterización molecular de los aislamientos bacterianos con mejor capacidad antagónica contra <i>Fusarium spp.</i> .....	36
7.3.1	Extracción de ADN .....	36
7.3.2	Electroforesis de ácidos nucleicos .....	37
7.3.3	Amplificación del gen ribosomal 16S .....	37
7.3.4	Secuenciación y análisis.....	38
7.4	Análisis estadístico.....	38
8.	RESULTADOS .....	40
8.1	AISLAMIENTO DE <i>Fusarium spp.</i> PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE CULTIVOS DE FRESA .....	40
8.1.1	Descripción macroscópica y microscópica de <i>Fusarium spp.</i> .....	40
8.1.2	Identificación taxonómica de los <i>Fusarium spp.</i> mediante el gen ARNr 28S.. .....	42
8.2	AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE CULTIVOS DE FRESA .....	44
8.2.1	Descripción macroscópica y microscópica de bacterias .....	44
8.2.2	Prueba de antagonismo dual de aislados bacterianos contra <i>Fusarium spp.</i> .. .....	50
8.2.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra <i>Fusarium spp.</i> .....	54

8.2.4	Efecto del pH sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra <i>Fusarium spp.</i> ....	56
8.2.5	Antagonismo por compuestos volátiles.....	57
8.2.6	Antagonismo por compuestos no volátiles.....	59
8.3	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS CON MEJOR ANTAGONISMO CONTRA <i>Fusarium spp.</i> MEDIANTE EL GEN ARNr 16S.....	61
9.	CONCLUSIONES.....	64
10.	RECOMENDACIONES.....	65
11.	ANEXOS .....	66
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	78

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Aislados de <i>Fusarium spp.</i> procedentes de muestras de suelo de plantas enfermas de fresa .....	40
Figura 2. Verificación de la calidad del ADN total de <i>Fusarium spp.</i> .....	42
Figura 3. Verificación de la calidad del ADN amplificado de <i>Fusarium spp.</i> .....	43
Figura 4. Morfología macroscópica de algunos de los aislados obtenidos de muestras de suelo de plantas enfermas de fresa .....	45
Figura 5. Tinción de Gram en aislados bacterianos de suelo .....	46
Figura 6. Análisis de clúster de los aislados bacterianos de muestras de suelo. ....	47
Figura 7. Morfología macroscópica de algunos de los aislados obtenidos de muestras de raíz de plantas enfermas de fresa .....	48
Figura 8. Tinción de Gram en aislados bacterianos de raíz .....	49
Figura 9. Análisis de clúster de los aislados bacterianos de muestras de raíz. ....	50
Figura 10. Verificación de la calidad del ADN total de bacterias aisladas .....	61
Figura 11. Verificación de la calidad del ADN amplificado de bacterias aisladas .....	62

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Principales enfermedades de la fresa.....	19
Tabla 2.	Agroquímicos utilizados en el cultivo de fresa.....	22
Tabla 3.	Diseño experimental para la prueba de antagonismo dual. ....	38
Tabla 4.	Diseño experimental para las pruebas de temperatura y pH.....	38
Tabla 5.	Diseño experimental para las pruebas de compuestos volátiles y no volátiles. .....	39
Tabla 6.	Tabla de frecuencias de <i>Fusarium spp.</i> SH3 .....	51
Tabla 7.	Análisis de comparación LSD Fisher de <i>Fusarium spp.</i> SH3 .....	51
Tabla 8.	Tabla de frecuencias de <i>Fusarium spp.</i> SH26 .....	52
Tabla 9.	Análisis de comparación LSD Fisher de <i>Fusarium spp.</i> SH26 .....	53
Tabla 10.	Análisis de comparación LSD Fisher del efecto de la temperatura sobre el antagonismo de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26. ....	54
Tabla 11.	Análisis de comparación LSD Fisher del efecto de la temperatura sobre el antagonismo de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26. ....	55
Tabla 12.	Análisis de comparación LSD Fisher del efecto del pH sobre el antagonismo de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26. ....	56
Tabla 13.	Análisis de comparación LSD Fisher del efecto del pH sobre el antagonismo de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26. ....	56
Tabla 14.	Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos volátiles de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26.....	58
Tabla 15.	Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos volátiles de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26.....	58
Tabla 16.	Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos no volátiles de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26.....	59
Tabla 17.	Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos no volátiles de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26.....	60

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Características morfológicas macro y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de suelo de Silvia, Cauca. ....	66
ANEXO 2. Características morfológicas macro y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de raíz de Silvia, Cauca.....	69
ANEXO 3. Análisis estadístico de <i>Fusarium spp.</i> SH3 y <i>Fusarium spp.</i> SH26 .....	71
ANEXO 4. Análisis de comparación LSD Fisher <i>Fusarium spp.</i> SH3 .....	72
ANEXO 5. Análisis de comparación LSD Fisher <i>Fusarium spp.</i> SH26 .....	73
ANEXO 6. Análisis estadístico de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 a diferentes temperaturas.....	74
ANEXO 7. Análisis estadístico de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 a diferentes temperaturas.....	74
ANEXO 8. Análisis estadístico de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 a diferentes pH	75
ANEXO 9. Análisis estadístico de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 a diferentes pH	75
ANEXO 10. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos volátiles de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 .....	76
ANEXO 11. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos volátiles de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 .....	76
ANEXO 12. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos no volátiles de SB14 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 .....	77
ANEXO 13. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos no volátiles de SB68 contra <i>Fusarium spp.</i> SH3 y SH26 .....	77

## 1. RESUMEN

La fresa es una planta con una alta producción en todo el mundo, sin embargo, es muy susceptible al ataque de enfermedades, como la podredumbre de raíz por *Fusarium spp.*, que ha obligado a la utilización de grandes cantidades de agroquímicos para su control. Esto ha generado que en la actualidad existe una creciente demanda de reemplazar la utilización de agroquímicos por productos más amigables con el medio ambiente, como el control biológico con bacterias, debido a que permite conservar los recursos naturales y no contamina el entorno. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antagonista de bacterias presentes en cultivo de fresa contra cepas silvestres de *Fusarium spp.* del municipio de Silvia, Cauca. Para ello inicialmente se obtuvieron cepas silvestres de *Fusarium spp.* de suelo y raíz de cultivos de fresa. Durante el aislamiento de *Fusarium spp.* se hizo una descripción macroscópica, microscópica, conservación en glicerol y en tubos con agar inclinado, y una caracterización molecular. Posteriormente se procedió a aislar bacterias de suelo y raíz de cultivos de fresa, y se hizo una descripción macroscópica, microscópica, conservación en glicerol y se hizo una prueba de antagonismo por cultivo dual entre las bacterias aisladas y las cepas de *Fusarium spp.* Seguido a esto, se eligieron las bacterias con mejor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y se evaluó su antagonismo contra *Fusarium spp.* por cultivo dual con variación de temperatura (10 y 20 °C) y pH (4,0, 5,0 y 6,0), además de su capacidad antagonista por compuestos volátiles y no volátiles. Como resultado de la purificación de hongos, se logró aislar 36 hongos, coincidiendo 2 cepas (*Fusarium spp.* SH3 y SH26) con las características propias de *Fusarium spp.* y en el análisis de la base de datos GenBank de las dos secuencias, se encontró que pertenecían al género *Fusarium incarnatum* y *Fusarium equiseti*, con una certeza de identidad del 99,24 y 99,81%, respectivamente. De igual forma, en la purificación de bacterias, se aislaron 98 morfologías, teniendo el mejor PICR contra *F. incarnatum* y *F. equiseti*, los aislados SB68 (68,9%) y SB14 (68,5%), respectivamente. Se evidenció que a medida que disminuye la temperatura se afecta la capacidad antagonista de las bacterias, encontrando que en ambos casos los PICR más bajos fueron a 10 °C, así mismo, el aislado SB14 presentó una mejor tolerancia al cambio de temperatura que el SB68 con lo que respecta a antagonismo. El antagonismo con modificación del pH mostró un mayor PICR en el aislado SB14 (44,8 a 59,1%) en comparación a SB68 (9,3 a 38,4%), presentando una mejor tolerancia. En cuanto a la producción de compuestos volátiles, la morfología SB14 se encontró la mayor inhibición contra *F. incarnatum* con un 8,0%, mientras que el aislado SB68 presentó un antagonismo máximo del 1,3% contra *F. equiseti*. El antagonismo por compuestos no volátiles tuvo en la mayoría de casos la mayor inhibición con el caldo con 24 h de inoculación, presentando el mejor PICR el aislado SB14 a las 24 h con un 20,6%

contra *F. incarnatum* y un 52,5% contra *F. equiseti*, mientras que SB68 contra *F. incarnatum* y *F. equiseti* obtuvo un 9,0 y 3,7%, respectivamente. En el análisis de la base de datos GenBank de las dos secuencias de bacterias, indicó con un 91,18% certeza que la identidad de la cepa SB14 corresponde al género *Bacillus siamensis* y el aislado SB68 se identificó como *Bacillus velezensis*, con un porcentaje de identidad del 90,16%.

## 2. ABSTRACT

Strawberry is a plant with a high production worldwide, however, it is very susceptible to disease attack, such as root rot by *Fusarium spp.* which has forced the use of large amounts of agrochemicals for its control. As a result, there is currently a growing demand to replace the use of agrochemicals with more environmentally friendly products, such as biological control with bacteria, because it conserves natural resources and does not pollute the environment. The objective of this research was to evaluate the antagonistic activity of bacteria present in strawberry crops against wild strains of *Fusarium spp.* from the municipality of Silvia, Cauca. Were initially obtained from the soil and roots of strawberry crops. During the isolation of *Fusarium spp.* a macroscopic and microscopic description, preservation in glycerol and in tubes with slant agar, and molecular characterization were carried out. Subsequently, bacteria were isolated from soil and roots of strawberry crops, and a macroscopic and microscopic description, conservation in glycerol, and an antagonism test by dual culture between the isolated bacteria and the strains of *Fusarium spp.* was performed. After this, the bacteria with the best percentage of radial growth inhibition (PICR) were selected and their antagonism against *Fusarium spp.* was evaluated by dual culture with temperature variation (10 and 20 °C) and pH (4.0, 5.0 and 6.0), in addition to their antagonistic capacity for volatile and non-volatile compounds. As a result of the purification of fungi, 36 fungi were isolated, two strains (*Fusarium spp.* SH3 and SH26) coinciding with the characteristics of *Fusarium spp.* and in the analysis of the GenBank database of the two sequences, it was found that they belonged to the genus *Fusarium incarnatum* and *Fusarium equiseti*, with a certainty of identity of 99.24 and 99.81%, respectively. Similarly, in the purification of bacteria, 98 morphologies were isolated, with the best PICR against *F. incarnatum* and *F. equiseti*, isolates SB68 (68.9%) and SB14 (68.5%), respectively. It was evidenced that as the temperature decreases, the antagonistic capacity of the bacteria is affected, finding that in both cases the lowest PICR were at 10 °C, likewise, isolate SB14 presented better tolerance to temperature change than SB68 with respect to antagonism. Antagonism with pH modification showed a higher PICR in isolate SB14 (44.8 to 59.1%) compared to SB68 (9.3 to 38.4%), showing better tolerance. Regarding the production of volatile compounds, the SB14 morphology showed the highest inhibition against *F. incarnatum* with 8.0%, while the SB68 isolate showed a maximum antagonism of 1.3% against *F. equiseti*. The antagonism by non-volatile compounds had in most cases the highest inhibition with the broth with 24 h of inoculation, presenting the best PICR the isolate SB14 at 24 h with 20.6% against *F. incarnatum* and 52.5% against *F. equiseti*, while SB68 against *F. incarnatum* and *F. equiseti* obtained 9.0 and 3.7%, respectively. Analysis of the GenBank database of the two bacterial sequences indicated with 91.18% certainty that

the identity of strain SB14 corresponds to the genus *Bacillus siamensis* and isolate SB68 was identified as *Bacillus velezensis*, with an identity percentage of 90.16%.

### 3. INTRODUCCIÓN

La fresa es una fruta que para el año 2021 se produjo a nivel mundial 9,2M ton, siendo los principales productores China (3,4M ton) y Estados Unidos (1,2M ton), en cuanto a América del sur, el país con mayor producción es Brasil (0,2M ton), seguido por Colombia con 0,09M Ton (FAOSTAT, s.f.). Para el mismo año, los principales departamentos productores en Colombia fueron, Cundinamarca (0,05M ton), Antioquia (0,01M ton) y Cauca (0,01M ton), siendo los principales municipios productores para este último, Sotara, Silvia y Purace, representando el 70,8, 15,9 y 9,4%, respectivamente (Agronet, 2023).

La fresa se comercializa un 55% en fresco, un 25% en pulpas y deshidratada, mientras el 20% en mermelada y procesada (Minagricultura, 2021). Para el 2021, se exportó a países como Canadá, Países Bajos, Curazao y Qatar un total de 3,8 Ton (Paola, S., 2023). Sin embargo, la fresa se ve muy afectada por diversas enfermedades producto de patógenos presentes en el ambiente, ocasionando diferentes afecciones que atacan el fruto (por ejemplo, *Botrytis cinerea*), las hojas (por ejemplo, *Mycosphaerella fragariae*, *Diplocarpon earliana*), la corona y la raíz (por ejemplo, *Phytophthora fragariae*- *Fusarium solani*), las cuales generan una reducción del rendimiento y pueden llegar a ocasionar la muerte de la planta. Entre las enfermedades transmitidas por suelo está la podredumbre en raíz producida por hongos, la cual al propagarse en el cultivo ha generado reportes de pérdidas económicas hasta del 30% en la producción. (Bisutti et al., 2017; Shen et al., 2016; Sun et al., 2021).

En Colombia para contrarrestar el efecto de estas plagas y enfermedades se emplea más de 40.000 ton de pesticidas por año que ocasionan altos niveles de contaminación en el medio ambiente y generan resistencia por parte de los microorganismos causantes de enfermedades, además de ser tóxicos para el ser humano (Castellanos et al., 2020; Katherine, D., & Bernal, A., 2017).

En la actualidad hay una creciente demanda de alternativas amigables con el medio ambiente para el manejo de enfermedades en la agricultura, entre las cuales se encuentra el uso de bacterias con capacidad biocontroladora. Esta estrategia permite conservar los recursos naturales como suelo y agua, dado que no genera ningún tipo de contaminación

al medio ambiente, y a diferencia de su contraparte química, son más eficientes y requieren pequeñas cantidades (Sabbahi et al., 2022).

Una fuente importante de bacterias biocontroladores es el ambiente natural, dado que las cepas nativas están mejor adaptadas a las condiciones ambientales, fisicoquímicas y de competencia propias de este ecosistema; lo cual se convierte en una ventaja cuando los microorganismos nativos seleccionados se devuelven al ecosistema para combatir las enfermedades (Bader et al., 2020; Benaissa, A., 2023). Para el caso específico del cultivo de fresa en el departamento del Cauca no hay información que relacione el potencial de bacterias silvestres con actividad antagónica frente a enfermedades que afectan este cultivo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antagónica de bacterias presentes en cultivo de fresa contra cepas silvestre de *Fusarium spp.*

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cepas de *Fusarium spp.* presentes en suelo y raíz del cultivo de fresa.
- Determinar el efecto antagónico de bacterias aisladas del suelo y raíz de cultivo de fresa contra cepas de *Fusarium spp.*
- Caracterizar molecularmente los aislamientos bacterianos con mejor capacidad antagónica contra cepas de *Fusarium spp.*

## 5. MARCO REFERENCIAL

### 5.1 LOCALIZACIÓN

Para el desarrollo de este estudio, se llevó a cabo una fase de campo en Silvia-Cauca y una fase de laboratorio en la ciudad de Popayán, en el Centro Internacional Biotecnológico Agroindustrial (CBA) de la Facultad de Ciencias Agrarias perteneciente a la Universidad del Cauca.

### 5.2 MARCO TEÓRICO

#### 5.2.1 Características del cultivo de fresa.

La fresa (*Fragaria sp.*) es una planta que pertenece a la familia Rosaceae, del género *Fragaria*, que se destaca por su contenido en vitamina C, taninos, flavonoides, antocianinas, catequina, quercetina y kaempferol, ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico, salicílico y elágico) y minerales (K, P, Ca, Na y Fe) así como pigmentos y aceites esenciales (Vergara, M. et al, 2018). Las variedades más sembradas en Colombia: Camarrosa, Albión, Camino Real, Monterrey, Portola, Ventana y Palomar (Minagricultura, 2021). Es un cultivo que soporta temperaturas hasta 20 °C, las zonas óptimas de producción son de 1.800 a 2.300 m.s.n.m, además su fruto se presenta como un receptáculo rojo, carnoso, con numerosos aquenios pequeños en la superficie, la parte roja de la fresa es denominada *eterio*, mientras que la semilla se encuentra alrededor de la superficie de la fruta y son de color amarillento (Flórez Faura, R., & Mora Cabeza, R. A., 2010).

#### 5.2.2 Enfermedades del cultivo de fresa.

Entre las enfermedades que afectan el cultivo de fresa, están las causadas por plagas, que pueden alterar el desarrollo de la planta. Las principales plagas que afectan a la fresa son: Araña roja (ácaros) (*Tetranychus urticae*), Nematodos (gusanos) (*Aphelenchoides fragariae*), Thrips (insectos) (*Frankliella occidentalis*), pulgones (áfidos) (*Chaetosiphon fragaefolii*), Babosas (*Arion hortensis*), y gusanos blancos o cutzos (*Hoplia callipyge*), los cuales pueden ocasionar podredumbre del fruto, manchas, agujeros en hojas, deformaciones de la corona y flores, y en caso de no controlarse puede generar la muerte

de la planta (Higuita, F., 1983). Para el control de estas plagas se usan agroquímicos como, Clorpirifos, Carbosulfan, Profenosl, Piriproxyfec (ICA, 2022).

Por otra parte, el cultivo de fresa, también es susceptible al ataque por enfermedades, como las causadas por hongos y bacterias, los cuales generan podredumbre de la podredumbre de raíz, marchitez de la planta, daño foliar y hojas, entre otros. Para su manejo y control se utilizan productos químicos y biológicos. En la Tabla 1, se observa con más detalle las enfermedades más usuales del cultivo de fresa.

Tabla 1. Principales enfermedades de la fresa.

Enfermedad	Descripción	Métodos de control
<b>Mancha Angular Foliar por <i>Xanthomonas fragariae</i></b>	Genera lesiones pequeñas, húmedas, por el envés de la hoja que se alargan hasta formar manchas angulares. Son translúcidas cuando son vistas a contraluz y de coloración verde oscuro cuando se miran con luz reflejada.	<b>Químico:</b> Estreptomicina y Oxitetraciclina <b>Biológico:</b> Biopreparados elaborado a partir de raíces de plantas, ortiga, borraja, kikuyo, trébol blanco.
<b>Mancha por <i>Mycosphaerella Mycosphaerella fragariae</i></b>	Genera manchas pequeñas, de color morado oscuro de forma redonda en el haz de la hoja y en las hojas viejas, la parte central de la lesión cambia de café a gris y finalmente a blanco, estas manchas pueden causar muerte del follaje.	<b>Químico:</b> Opera y Cantus. <b>Biológico:</b> Biopreparados.
<b>Moho Gris: <i>Botrytis cinérea</i></b>	Provoca que los pétalos y pedicelos de flores afectadas se tornan cafés provocando la inflorescencias y muerte de la misma. También, se presenta en la parte final del cáliz, en los tejidos contiguos a la fruta podrida.	<b>Químico:</b> Thiophanate, Iprodione, Boscalid, Cyprodinil, Pytimethanil, Fludioxonil, Captan, Thiram. <b>Biológico:</b> <i>Trichoderma spp.</i>
<b>Marchitez y amarillamiento por <i>Fusarium</i>: <i>Fusarium spp.</i></b>	Provoca marchitez del follaje y enanismo en las plantas, llegando a ocasionar la muerte de la planta.	<b>Químico:</b> Benzimidazoles. <b>Biológico:</b> Biopreparados. <i>Bacillus spp</i>
<b>Antracnosis o</b>	Genera en el fruto puntos color café claro y con apariencia húmeda, además, afecta las flores, provocando que se sequen y mueran.	<b>Químico:</b> Benomyl y thiram. <b>Biológico:</b> Biopreparados, <i>Trichoderma spp.</i>

---

**Mancha Negra:**

***Colletotrichum***

***spp.***

***Rhizoctonia solani***

Las hojas se tornan de color púrpura y tienden a enrollarse hacia arriba. La corona original muere y se desarrollan coronas laterales. Puede presentarse una coloración café en los tejidos basales internos de las coronas infectadas. Además, puede generar podredumbre en raíz.

**Químico:** Benzimidazoles y ditiocarbamatos,

**Biológico:** Biopreparados, *Bacillus spp.*

**Marchitez por *Verticillium spp.***

Afecta el desarrollo de las hojas de la planta, además que puede causar podredumbre en raíz.

**Químico:** Benzimidazoles

**Biológico:** Biopreparados, *Bacillus spp.*, *Trichoderma spp.*

**Pudrición roja de la raíz *Phytophthora spp.***

Genera que las hojas más viejas se tornan rojas, anaranjadas o amarillas. Puede causar pudrición raíces de la planta progresivamente de la punta hasta la corona.

**Químico:** Azoxystrobin, benalaxil, clorotalonil, cyazofamid, fenamidone, iprovalicarb, metalaxil.

**Biológico:** Biopreparados, *Bacillus spp.*

---

Fuente: Higueta, F., 1983; Cano, M., 2013; Morales-Mora, L. A., et al 2020; Bárcenas-Santana, D., et al, 2019; Granados-Montero, M., 2022; ICA, 2022.

### **5.2.3 *Fusarium spp.***

Las especies de *Fusarium spp.* están distribuidas en todo el mundo, encontrándose comúnmente en el suelo como clamidosporas o como hifas en materia orgánica, existiendo muchas especies que abundan en pastizales y en suelos cultivados; el género *Fusarium spp.* se caracteriza por tener un desarrollo abundante de micelio aéreo de textura algodonosa y de color blanco, además de poseer macronidios ligeramente curvos de uno a cinco septos y microconidios en forma ovoide (Morales et al., 2020; Campbell, C., E., et al 2013; Watanabe, T., 2010). La podredumbre de raíz por *Fusarium spp.* es una de las enfermedades de las plantas más devastadoras del mundo, el Departamento de Agricultura de EE. UU (USDA) clasifica el tizón de la espiga por *Fusarium spp.* como la peor enfermedad vegetal que ha afectado a EE.UU. desde las epidemias de roya de los años cincuenta (Abdel-Azeem, et al, 2019), además se ha generado reportes de pérdidas económicas hasta del 30% en la producción (Shen et al., 2016; Sun et al., 2021). Dependiendo de la cepa de *Fusarium spp.*, puede atacar diferentes cultivos, por ejemplo, la mora, trigo, calabaza y alfalfa por *F. acuminatum*, clavel, lenteja, brócoli, linaza, frambuesa, melocotones por *F. avenaceum*, banano, pepino, clavel, tomate, sandía, melón y fresa por *F. oxysporum* (Summerell, B. A., et al, 2011). Se ha estimado que el ataque por *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* a la industria bananera de India puede causar pérdidas por 500 mil millones de rupias indias (alrededor de 7 mil millones de dólares estadounidenses) (Bubici, et al, 2019). Un problema para el control de *Fusarium spp.* es la capacidad de resistir la fumigación en el suelo, como reporta Gordon, T. R., et al (2016), quien realizó una fumigación por goteo en camas de cultivo de fresa con mezcla 1:1 de bromuro de metilo y cloropicrina a 448 kg/ha, encontrando que la fumigación no logro eliminar la propagación del patógeno, dado que se encontraba de forma abundante a una profundidad de 30 cm en el suelo. Además, algunas especies de *Fusarium spp.* se encuentran comúnmente como contaminantes en productos alimenticios, ambientes interiores y procesos industriales, dado que cuentan con la capacidad de producir metabolitos secundarios tóxicos (tricotecenos, zearalenona, las fusarinas, la moniliformina y las fumonisinas) que pueden contaminar los productos agrícolas, que pueden llegar a generar trastornos neurológicos, inmunosupresión, daño gastrointestinal y hemorragia (Abdel-Azeem, A. M., 2019; Podgórska-Kryszczuk, I., 2022)

### **5.2.4 Estrategia de control de enfermedades en cultivo de fresa.**

#### **5.2.4.1 Control cultural.**

Existen diferentes formas de controlar las enfermedades de cultivos sin aplicar plaguicidas, entre los más utilizados, está la utilización de plantas resistentes a la infección, la rotación de cultivos y agregar enmiendas orgánicas al suelo, como abonos, estiércol animal compostado y abonos verdes de cultivos de cobertura, para el manejo de enfermedades (Fang, X., et al, 2012). También se ha investigado la vaporización, la solarización, a desinfestación anaeróbica del suelo antes de la siembra para el control de malezas y patógenos transmitidos por el suelo (Koike, S. T., & Gordon, T. R., 2015).

#### 5.2.4.2 Control Químico.

Una forma de controlar o mitigar las afectaciones producidas sobre el cultivo es recurrir a agroquímicos, estos actúan de manera eficiente hasta el punto de llegar a matar o disminuir el agente causal de enfermedad. Sin embargo, el uso excesivo de estos, es perjudicial al medio ambiente, puede degradar el suelo y sobre afectar la salud humana; algunos de los químicos de mayor aplicación se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Agroquímicos utilizados en el cultivo de fresa

Agroquímico	Ingrediente activo	Clasificación	Tipología química	Blanco biológico
Sialex 50 sc	Procimidona	Fungicida sintético	Organoclorados	Inhíbe por contacto, controla esporas, inhibe el crecimiento de hifas. Afecta hongos como <i>B. cinérea</i> .
Deminak, bordo, y mirage 45 ec	Prochloraz	Fungicida sistémico	Organoclorado	Acción preventiva y curativa, puede ser aplicada por contacto directo, se utiliza en campo y la postcosecha. Normalmente es utilizado para el control del <i>B. cinérea</i> .

Azimut®320 sc	Tebuconazole - zoxystrobine	Fungicida sistémico y de contacto	Organoclorado	Su aplicación es de forma directa, evita la germinación de esporas. Se usa principalmente en la Mancha de las hojas <i>Mycosphaerella fragariae</i> , asimismo, este fungicida controla la enfermedad del <i>B. cinérea</i> .
Belico 500 sc, derosal 50 sc, carbendazim, cropzim 500 cs, evozim 500 sc, fordazim, fenix	Carbendazim y benomil	Fungicida	Carbamato	Son de rápida penetración, de amplio espectro, intervienen en grupos reducidos de bacterias. Es aplicado por aspersion foliar y actúa sobre la división celular de los agentes patógenos causantes de las enfermedades de pudrición ( <i>B. cinérea</i> ), mancha de la hoja ( <i>Cercospora spp</i> ) y antracosis ( <i>C. spp</i> ).
Luna tranquility	Fluopyram	Fungicida sistémico	Organofosforado	Es conocida por sus propiedades preventivas y por su control eficaz de las enfermedades fúngicas, <i>B. cinérea</i> . Además

---

de que ayuda a aumentar el ciclo de vida y el rendimiento en la cosecha.

---

Fuente: ICA, 2022; Técnica, N., 2015; Higuira, F., 1983.

#### 5.2.4.3 Control biológico.

El control biológico es una alternativa para el uso de agroquímicos, el cual no genera contaminación al medio ambiente, intoxicaciones al ser humano y resistencia en microorganismos, permite mejorar la diversidad del suelo y algunos son promotores del crecimiento (Koike, S. T., & Gordon, T. R., 2015). Entre los microorganismos más utilizados como biocontroladores están los *Neoseiulus californicus*, *Phytoseiulus Persimilis*, las *Pseudomonas* spp, los *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. konigiopsis*, *Bacillus subtilis*, *Pantoea* spp., *Variovorax* spp., *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces racemochromogenes* (Cano, M., 2013). Estos microorganismos cuentan con diversos mecanismos de acción para el control de patógenos, los cuales incluyen la competencia por nutrientes y espacio, el parasitismo y micoparasitismo, la producción de antibióticos, enzimas líticas, sideróforos y otros metabolitos secundarios de interés, y la estimulación del sistema de defensas en la planta huésped, entre otros (Cano, M., 2013; Cruz Coronel, A. 2022). El estudio de microorganismos antagonistas se ha vuelto popular en la formulación de bioinsumos y de fertilizantes bioorgánicos, encontrando que permiten la colonización de bacterias antagónicas en la rizosfera, además, se ha reportado experimentos de bioformulados que han permitido controlar la enfermedad de marchitamiento por *Fusarium* spp. en pimientos, melon y plátano (Chen, et al, 2020).

## 6. MARCO HISTÓRICO

A continuación, se presentan diferentes investigaciones relacionadas con podredumbre de raíz en fresa causada por el hongo *Fusarium spp.*

Pastrana, A., et al (2016), realizaron un trabajo en España en el cual compararon la eficiencia de dos agentes de biocontrol contra *Fusarium solani* en fresa, en este estudio se obtuvo que las cepas *Bacillus megaterium* y *Bacillus laterosporus* inhiben en más del 36% el crecimiento radial de *F. solani* y además su aplicación preventiva puede reducir la incidencia de muertes en un 50% en comparación con las plantas de fresa no tratadas, reduciendo significativamente la incidencia y la propagación de la enfermedad.

Abd-El-Kareem, et al (2021), hicieron una investigación en Egipto sobre el manejo de la podredumbre negra en fresa utilizando *Bacillus pumilus* como biocontrol de *Rhizoctonia solani*, *Pythium spp.* y *Fusarium solani*, en su metodología usaron la técnica de cultivo dual para estimar la inhibición en el crecimiento del micelio de los hongos patógenos, adicionalmente realizaron evaluación en campo. Entre los resultados más importantes *In vitro* está el control de *R. solani*, *Pythium sp.* y *F. solani*, del 85,2, 89 y 83,6%, respectivamente, y en campo, la inhibición de *Pythium sp.* y *F. solani* fue de 64,4 y 68,9 %.

Ghazala, et al (2022) realizaron un estudio en Túnez sobre la capacidad biocontroladora del *Bacillus mojavensis* contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum*. Se realizó cultivo dual y antagonismo por compuestos volátiles y dentro de sus resultados está la inhibición significativa del crecimiento del micelio de *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *R. solani* en un 63, 63 y 46,5% por contacto directo, mientras que la inhibición por compuestos volátiles osciló entre el 16 % y el 76%.

Koike, S. T., & Gordon, T. R. (2015), en su estudio establecieron que hay diferentes formas de controlar *Fusarium spp.* en cultivos de fresa, entre estos métodos están los organismos de control biológico como *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis*, sin embargo, establecen también que no se han desarrollado productos comercialmente viables para su uso contra el marchitamiento por *Fusarium spp.* en fresa.

Chen, Y., et al (2020), en su trabajo determinaron la capacidad antagonista de bacterias aisladas de suelo rizosférico de un cultivo de fresa contra *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae*. En este estudio se obtuvo que las cepas *Bacillus licheniformis* X-1 y *Bacillus methylotrophicus* Z-1 inhiben el crecimiento del fitopatógeno en un 75,7 y 70,2%, respectivamente.

Li, X. et al (2020), evaluaron el efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias contra *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum*. Entre los resultados más importantes *In vitro* está el antagonismo de *Bacillus velezensis* CT32 por compuestos volátiles contra *V. dahliae* y *F. oxysporum*, en un 66,94 % y un 45,72 %, respectivamente.

Elbouzaoui, A., et al (2022), en su estudio evaluaron el biocontrol de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* contra la marchitez por *Fusarium oxysporum f.sp ciceris*. Dentro de sus resultados más importantes está *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus peoriae* y *Bacillus halotolerans*, con porcentajes de inhibición de 75, 58 y 54% respectivamente.

Guevara-Avenidaño, E. et al (2020), realizaron sobre la inhibición por compuestos orgánicos difusibles y volátiles de bacterias rizosféricas contra *Fusarium kuroshium*. Entre los resultados más importantes estuvo la inhibición por compuestos difusibles hasta de un 48,48%. Por otra parte, la máxima inhibición por compuestos volátiles fue del 69,88%.

Nagraj, D., Achar, P. N., & Sreenivasa, M. Y. (2021), realizaron una revisión sobre el manejo de *Fusarium verticillioides* mediante agentes de biocontrol. Dentro de sus resultados está que *Bacillus subtilis* (50%), *Lactobacillus rhamnococcus* (78-92%) y *Pseudomonas solanaceacum* (70%) presentan capacidad biocontroladora de *F. verticillioides*.

Bubici, G., et al (2019), hicieron una investigación sobre el biocontrol de *Fusarium spp.* del plátano, reportando que en condiciones de campo *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* se ha controlado hasta en un 79% utilizando *Pseudomonas spp.* y en un 42 al 55% con *Bacillus spp.*

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 IDENTIFICACIÓN DE *Fusarium spp.* PRESENTE EN SUELO Y RAÍZ DEL CULTIVO DE FRESA**

A continuación, se presenta la metodología que se empleó para el aislamiento, identificación macroscópica, microscópica y caracterización molecular de las cepas de *Fusarium spp.* obtenidas de Silvia, Cauca. Estas actividades se hicieron en conjunto con el trabajo de pregrado del programa de Ingeniería Agroindustrial de las estudiantes Ana María Silva Benavides y Martha Isabel Vivas Sandoval.

#### **7.1.1 Muestreo.**

Se visitaron 2 fincas productoras de fresa que presentaban prevalencia de la enfermedad de podredumbre de raíz en el momento del muestreo, ubicadas en el municipio de Silvia, Cauca en las veredas el Manzanal y las Delicias. Los sitios de muestreo en cada finca fueron seleccionados mediante la observación de plantas que presentaron síntomas de enfermedad en corona y raíz como enanismo, coloración verde grisáceo de las hojas más viejas y pudrición de las raíces, lo anterior, teniendo en cuenta que *Fusarium spp.* es uno de los agentes causantes de esta enfermedad. Para la toma de muestras de suelo rizosférico se hizo un muestreo compuesto, recolectando aproximando 100 g de suelo por planta afectada hasta completar los 500 g de suelo, esta acción se repitió 3 veces en cada finca. La toma de muestras se realizó aproximadamente a 10 cm de profundidad, utilizando un palín desinfectado con alcohol al 70%. En cuanto a las muestras de raíz, se hizo por muestreo simple, extrayendo la planta completa, para un total de 3 muestras por finca. Todas las muestras se guardaron en bolsas Ziploc, debidamente rotuladas, se almacenaron en una caja de Icopor y se transportaron al Centro Internacional Biotecnológico Agroindustrial (CBA) de la Universidad del Cauca, en donde se procesaron en el menor tiempo posible (Koike, S. T., & Gordon, T. R., 2015).

#### **7.1.2 Aislamiento de *Fusarium spp.* presente en suelo y raíz de cultivos de fresa.**

De cada muestra de suelo recolectada se tomaron 10 g y se adicionaron a un matraz de Erlenmeyer junto a 90 mL de agua estéril y se homogeneizaron en un shaker (MaxQ 4450 orbital Thermo Fisher Scientific, USA) por 30 min a 120 rpm. Posteriormente se realizaron

diluciones sucesivas hasta  $10^{-6}$  y se inocularon 0,1 mL de cada dilución mediante siembra por superficie y se hizo una distribución por perlas en placas de Petri con agar Extracto de Levadura-Glucosa-Cloranfenicol (YGC) y estas se llevaron a una incubadora (Binder Modelo BD 115, USA) a 28°C de 3 a 5 días (Chen et al, 2018).

Las raíces recolectadas se lavaron con agua destilada estéril, se cortaron fragmentos de 1 cm de cada muestra de raíz y se inocularon 3 trozos en puntos extremos de placas de Petri con agar YGC y se llevaron a incubación por 3 a 5 días a 28°C (Ngo et al, 2020).

### **7.1.3 Purificación.**

Se seleccionaron las cajas de Petri que contenían colonias con características similares a *Fusarium spp.* (colonia de color blanco con textura algodonosa), las cuales fueron purificadas por punción en cajas de Petri con YGC y se llevaron a incubar a 28°C por 5 días. Cada aislado obtenido de muestras de suelo se identificó como "SH" y los obtenidos de raíz como "RH", cada sigla fue seguida de un número que representa la colonia aislada.

### **7.1.4 Descripción macroscópica y microscópica de las colonias purificadas.**

Para la descripción de la morfología macroscópica se evaluaron criterios como topografía, textura y color; también se hizo una descripción microscópica de la cepa fúngica mediante la técnica de tinción con azul de lactofenol y se observó en un microscopio (Zeiss Axio Lab. A1, China) a 40X y 100X, y las imágenes se tomaron con una cámara AmScope.

Los resultados obtenidos se compararon con los manuales de Campbell, C., E., et al (2013) y Watanabe, T. (2010) para la identificación de los hongos y se seleccionaron las cepas que presentaron características similares a *Fusarium spp.*

### **7.1.5 Conservación.**

Para conservar las cepas obtenidas de *Fusarium spp.* se realizaron dos métodos. Para el primer método, se inició con la inoculación del hongo en un Erlenmeyer con 50 mL de agua peptonada y se llevó a incubación por 5 días a 28°C. Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron 45 mL y se transfirieron a un tubo falcón, el cual fue llevado a una centrifuga (Megafuge ST1 Plus Centrifuge Series, USA) por 20 min a 3800 rpm, eliminando el sobrenadante. A la biomasa precipitada se le adicionó 2 mL de agua peptonada y 2 mL de glicerina al 60% y se mezcló en un vórtex (Vortex MX-S Velocidad Regulable) por 15 s. Posteriormente, se tomó 1 mL de la solución y se adicionó a un vial, para ser transferido a un congelador (Thermo Scientific TSV, USA) a -20 °C. Este proceso se hizo por triplicado (Riveros, N., & Rosero, R., 2019).

Para el segundo método, las cepas de *Fusarium spp.* fueron conservadas en tubos con agar YGC inclinado, en donde se inocularon por punción y se sellaron con Parafilm. Posteriormente, se llevaron a incubación a 28 °C por 5 días y finalmente se conservaron a 4°C (Sosa López et al, 2011)

### **7.1.6 Caracterización molecular de *Fusarium spp.***

#### **7.1.6.1 Extracción de ADN.**

Para la caracterización molecular de *Fusarium spp.* se realizó una extracción de ADN por solventes, para lo cual se comenzó con la inoculación por disco del hongo en una caja de Petri con agar YGC por 5 días. Seguido a esto, se hizo un raspado de todo el micelio mediante un asa y se adicionó a un falcón de 15 mL, para posteriormente agregarle 5 mL de tampón SET y llevarlo a centrifugar a 4500 rpm por 20 min. Se eliminó el sobrenadante del falcon, se adicionó 1 mL de tampón SET, se agitó en un vortex por 30 s, se añadió 1 mL de lisozima y se dejó en un baño maría (WTB6, Alemania) a 37°C por 2 horas.

Transcurrido este tiempo, se agregó 5 µL de RNAsa y se dejó en baño maría a 37°C por 1 hora. A continuación, se adicionó 300 µL de SDS 10%, se agitó en un vortex por 15 s, se agregó 50 µL de proteínas K y se dejó en baño maría a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se adicionó 150 µL de acetato de sodio 3M, se dejó en hielo por 10 min y se agregó 500 µL de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, respectivamente), se aplicó vortex por 30 s y se centrifugó a 4500 rpm por 20 min. Del

sobrenadante obtenido se transfirió 1 mL a un vial y se agregó 500  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se aplicó vortex por 30 s y se llevó a una centrifuga (MicroCL 21R, USA) a 10.000 rpm por 1 hora. El sobrenadante que se obtuvo se transfirió a un vial junto a 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico frío y se dejó a -20°C por 14 horas. Transcurrido este tiempo, se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 30 min, luego se eliminó todo el sobrenadante y se adicionó 200  $\mu$ L de alcohol al 70%. Posteriormente, se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el vial se dejó a temperatura ambiente por 12 horas, se agregó 100  $\mu$ L de tampón TE 1X y se almacenó a -20°C. (Burbano et al., 2017).

#### **7.1.6.2 Electroforesis de ácidos nucleicos.**

Se preparó un gel de agarosa 1%, se adicionó 20  $\mu$ L de EZ-Vision y se colocó en una cámara de electroforesis (ENDURO™ Gel XL, USA) para ser sumergido en un tampón TAE 1X. Las muestras se prepararon mezclando 2  $\mu$ L de azul de bromofenol y 8  $\mu$ L de ADN, los cuales se adicionaron a cada pozo el gel y se sometieron a 70 voltios por 1 hora. Se usó como marcador de tamaño molecular lambda Hind III (Burbano et al., 2017).

#### **7.1.6.3 Amplificación del gen ribosomal 28S.**

Se realizó una amplificación del ARNr gen 28S por PCR utilizando los cebadores NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) Y NL4 (GGTCCGTTTCAAGACGC). Para esto, se adicionó en un tubo Eppendorf 18  $\mu$ L de agua ultrapura estéril, 25  $\mu$ L 2X PCR Taq MasterMix, 2  $\mu$ L de cebador NL1, 2  $\mu$ L de cebador NL4 y 3  $\mu$ L de ADN. La solución se mezcló y se adicionó en un tubo de PCR. Las condiciones de termociclado (MultiGene™ OptiMax, USA) fueron a 94 °C por 2 min; 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 45 s, 72 °C por 1 min con 30 s y una extensión final de 72 °C por 10 min. La calidad de los amplificados se verificó por electroforesis en gel agarosa a 1%, según lo descrito en el numeral 7.1.6.2, usando como marcador molecular 1Kb ladder (Olowe et al., 2022; Burbano et al., 2017).

#### **7.1.6.4 Secuenciación y análisis.**

Las secuencias amplificadas se enviaron al laboratorio SSiGMoL de la Universidad Nacional para su secuenciación. Una vez que se obtuvieron las secuencias se visualizaron y se editaron en el software BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7,7.

Las secuencias obtenidas después del proceso de edición se compararon en la base de datos GenBank (Burbano et al., 2017).

### **7.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO DE BACTERIAS AISLADAS DEL SUELO Y RAÍZ DE CULTIVO DE FRESA SOBRE *Fusarium spp.***

A continuación, se presenta la metodología que se utilizó para el muestreo, aislamiento, identificación macroscópica, microscópica, conservación y antagonismo contra *Fusarium spp.* de las bacterias que se encontraron en los cultivos de fresa.

#### **7.2.1 Muestreo.**

El muestreo de bacterias se realizó siguiendo el proceso descrito en el ítem 7.1.1., para evaluar la capacidad que tienen las bacterias de entornos que ya han sido afectados por la enfermedad.

#### **7.2.2 Aislamiento de bacterias presentes en suelo y raíz de cultivos de fresa.**

Para esta etapa, de cada muestra de suelo recolectada se tomaron 10 g, se adicionó en un Erlenmeyer con 90 mL de agua estéril y se llevó a un shaker por 30 min a 150 rpm. Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas en tubos de ensayo hasta  $10^{-6}$  y se inocularon 0,1 mL de cada dilución mediante siembra por superficie, seguido a eso se hizo una distribución por perlas en placas de Petri con Plate Count Agar (PCA) y estas se llevaron a incubación a 37 °C por dos días (Chen et al, 2020)

Las raíces recolectadas se lavaron con agua destilada estéril, se cortaron fragmentos de 1 cm de cada muestra de raíz y se inocularon 3 trozos en puntos extremos de placas de

Petri con agar PCA, posteriormente, las placas de Petri se llevaron a incubación por 2 días a 37°C (Ngo et al., 2020).

### **7.2.3 Purificación de bacterias.**

Se hizo una selección de las colonias que presentaron características macroscópicas diferentes y estas fueron purificadas en cajas de Petri con agar PCA y se incubaron a 37°C por 24 horas. Cada aislado obtenido de muestras de suelo se identificó como “SB” y los obtenidos de raíz como “RB”, cada sigla fue seguida de un número que representa la colonia aislada.

### **7.2.4 Descripción macroscópica y microscópica de bacterias.**

Para la identificación de las características macroscópicas de las colonias purificadas se usó un estereoscopio (SMDG-2T-6WB, China) y se evaluaron criterios como la forma, margen, elevación, superficie, propiedad óptica y color de cada aislado.

Por otra parte, para la descripción microscópica se realizó una Tinción de Gram y se observó en un microscopio a 100X, donde se clasificaron las bacterias en Gram positivas, Gram negativas, y por su morfología en cocos y en bacilos. Las imágenes fueron tomadas con una cámara AmScope.

Con la descripción macroscópica y microscópica de los aislados de suelo y los aislados de raíz, se realizó un análisis clúster usando el software Past versión 2.17c.

### **7.2.5 Conservación de bacterias.**

La conservación de las colonias se realizó mediante la inoculación de cada aislado en un tubo de ensayo con tapa rosca con 5 mL de Caldo Nutritivo (CN) y se incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente, el contenido del tubo se agregó en un Erlenmeyer con 50 mL de CN y se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Seguido a esto, se adicionó 45 mL del Erlenmeyer a un tubo falcón y se llevó a centrifugar por 20 min a 3800 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se adicionó 2 mL de CN, 2 mL de glicerina al 60%, y se mezcló en un vórtex por 15 s. Por último, se tomó 1 mL de la solución y se adicionó en un vial,

para ser transferido a un congelador a -20 °C. Este proceso se hizo por triplicado (Riveros, N., & Rosero, R., 2019; Ngo et al., 2020).

## **7.2.6 Prueba de antagonismo por cultivo dual entre bacterias aisladas y *Fusarium spp.***

### **7.2.6.1 Activación del hongo.**

Para esta prueba se hizo una activación de *Fusarium spp.* (obtenido en el objetivo 1) conservado en viales con glicerol mediante su inoculación en un tubo de ensayo con 5 mL de agua peptonada y se incubó a 28°C por 5 días. Posteriormente, se inoculó en el centro de una placa de Petri con YGC mediante punción y se llevó a incubación a 28°C por 5 días.

### **7.2.6.2 Activación de la bacteria.**

También se realizó una activación de las bacterias conservadas en los viales con glicerol mediante su inoculación en un tubo de ensayo con 5 mL de CN y se incubó a 37°C por 24 horas. Seguido a esto, se inoculó en una placa de Petri con agar Nutritivo (AN) y se incubó a 37°C por 24 horas para ver su pureza. Corroborada la pureza, se inocularon las bacterias en tubos de ensayo con 9 mL de CN, y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo, cada tubo fue agitado en un vortex por 10 s y mediante un aplicador se hizo siembra masiva de cada aislado en una caja con AN y se llevó a incubación por otras 24 horas a 37°C.

### **7.2.6.3 Antagonismo dual.**

El experimento de antagonismo dual inició con la siembra por discos (0,7 cm de diámetro) de *Fusarium spp.* en el centro de una caja de Petri con YGA (Glucosa, agar bacteriológico y extracto de levadura) y se dejó en incubación a 28°C por 48 horas. Posteriormente, de cada aislado bacteriano se tomaron discos de 0,7 cm de diámetro y se sembraron en las cajas con los hongos a una distancia de 2 cm, ubicando en cada caja 4 discos de bacterias diferentes. También se hizo una siembra por discos de *Fusarium spp.* en una caja de Petri con YGA sin aislado bacteriano como testigo y todas las cajas se incubaron a 28°C por 6 días (Ngo et al., 2020). Este ensayo se hizo por triplicado. Como variable

de respuesta se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) mediante la siguiente fórmula:

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Ecuación 1

Donde  $R_1$  es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y  $R_2$  es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual) (Lopez, S., & Victoria, D., 2016).

### **7.2.7 Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra *Fusarium spp.***

Las bacterias aisladas con mayor PICR fueron activadas siguiendo la metodología del ítem 7.2.6.1 y 7.2.6.2.

Para medir el efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica se aplicó la técnica de cultivo dual para lo cual se sembraron discos de *Fusarium spp.* en el centro de una caja de Petri con YGA y se dejó en incubación a 28°C por 48 horas. Posteriormente, se sacaron discos de los aislados bacterianos y se sembraron en las cajas con *Fusarium spp.* a una distancia de 2 cm. Teniendo en cuenta que la temperatura media de Silvia esta entre 12 a 21 °C (Alcaldía Municipal de Silvia, 2018), se realizaron dos tratamientos; en el tratamiento 1, las cajas se mantuvieron en incubación por 6 días a 20°C, mientras que le tratamiento 2, las cajas se incubaron a 10 °C por 24 días, inicialmente se dejó 6 días, sin embargo, no se observaron cambios en el crecimiento y se prolongó las observaciones hasta el día 24, sin lograr apreciar un cambio significativo. Como testigo se usaron cajas de Petri inoculadas con *Fusarium spp.* sin la presencia de los aislados bacterianos, este ensayo se hizo por triplicado. Finalmente se determinó el PICR de cada tratamiento usando la Ecuación 1 del ítem 6.2.6 (Gotor-Vila et al, 2017).

### **7.2.8 Efecto del pH sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra *Fusarium spp.***

Se hizo una activación de los aislados bacterianos que presentan mayor PICR contra *Fusarium spp.* siguiendo la metodología del ítem 7.2.6.1 y 7.2.6.2.

Para medir el efecto del pH sobre la capacidad antagonica de las bacterias, se tuvo en cuenta que el cultivo de fresa requiere un pH entre 5,7 y 6,5 (Flórez Faura, R., & Mora Cabeza, R. A., 2010). Por lo anterior, se realizó un antagonismo por cultivo dual a pH 4,0, 5,0 y 6,0, para esto se prepararon medios de cultivos de YGA ajustados a estos pH utilizando ácido clorhídrico e hidróxido de sodio al 5M cada uno.

Se hizo una siembra por discos de *Fusarium spp.* en el centro de las cajas de Petri con los pH ajustados y se dejó en incubación a 28°C por 48 horas. Posteriormente, se sacaron discos de los aislados bacterianos y se sembraron en las cajas con *Fusarium spp.* a una distancia de 2 cm del contenido fúngico y se incubaron a 28°C por 6 días. Como testigo se inocularon cajas con *Fusarium spp.* sin presencia de los aislados bacterianos y se incubó bajo las mismas condiciones. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se determinó la capacidad antagonica usando la Ecuación 1 del ítem 6.2.6 (Gotor-Vila et al, 2017).

#### **7.2.9 Antagonismo por metabolitos volátiles.**

Para esta etapa, se hizo una activación de los aislados bacterianos que presentan mayor PICR contra *Fusarium spp.* siguiendo la metodología del ítem 7.2.6.1 y 7.2.6.2.

Para la detección de metabolitos volátiles se realizó la inoculación de las bacterias utilizando un aplicador mediante la técnica de siembra masiva en cajas con AN, a su vez, se inocularon discos de *Fusarium spp.* en el centro de una caja de Petri con agar YGA. La caja de Petri con *Fusarium spp.* se colocó sobre la caja con el aislado bacteriano de forma invertida y se sellaron con Parafilm. Así mismo, se hizo un testigo sin inoculación del aislado bacteriano y todo se incubó a 28°C por 6 días. Esto se hizo por triplicado y se determinó el PICR usando la Ecuación 1 del ítem 6.2.6 (Toh et al., 2016; Ghazala et al., 2022).

#### **7.2.10 Antagonismo por metabolitos no volátiles.**

Se realizó una activación de los aislados bacterianos que presentan mayor PICR contra *Fusarium spp.* siguiendo la metodología del ítem 7.2.6.1 y 7.2.6.2.

Para determinar si los metabolitos no volátiles de los mejores aislados bacterianos tenían propiedades antimicrobianas contra *Fusarium spp.*, se inocularon en un Erlenmeyer con 50 mL de CN y se llevó a incubación a 37°C. Dado que no se realizó una curva de crecimiento, se eligieron 3 tiempos de muestreo, entre los cuales estuvo 12 horas por tener un buen crecimiento y 24 horas como tiempo máximo, para un total de 3 muestras (tiempo 0, 12 y 24 horas) de 1,5 mL en un vial y se llevaron a centrifugar por 20 min a 13.000 rpm. Se tomaron 1,2 mL de sobrenadante para ser adicionado en un nuevo vial y se llevó nuevamente a centrifugar por 20 min a 13.000 rpm; se tomaron 100 µL de sobrenadante y se adicionó en una caja con YGC y con ayuda de un aplicador se hizo siembra masiva. Posteriormente, se inoculó en el centro de la caja un disco de *Fusarium spp.* De igual forma se dejó un testigo de *Fusarium spp.* al cual solo se agregaron 100 µL de CN y todo se llevó a incubación a 28°C por 6 días. Esto se hizo por triplicado y se determinó el PICR usando la Ecuación 1 del ítem 6.2.6 (Toh et al., 2016).

### **7.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS CON MEJOR CAPACIDAD ANTAGÓNICA CONTRA *Fusarium spp.***

A continuación, se plantea la metodología con la cual se realizó la extracción del ADN, electroforesis, PCR y el análisis de la secuencia del ARNr gen 16S para identificar las bacterias con mayor potencial antagónico contra *Fusarium spp.*

#### **7.3.1 Extracción de ADN.**

Para la caracterización molecular de los aislados se realizó una extracción de ADN por solventes, para lo cual se comenzó con la inoculación del aislado en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo tripticasa de soya (TSB) y se llevó a incubación a 35°C por 24 horas. Posteriormente, se transfirió a un Erlenmeyer con 25 mL de TSB y se dejó incubando por 18 horas a 35°C, seguido a esto, se transfirió el contenido a un tubo falcón de 50 mL y se centrifugó a 3800 rpm por 20 min. Se eliminó el sobrenadante del falcón, se adicionó 2 mL de tampón TE, se homogeneizó, se agregó 1 mL de muestra a un vial y se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante, se añadió 567 µL de solución tampón TE, se agitó en un vortex por 30 s, se agregó 30 µL de SDS 10%, se agitó en un vortex por 30 s, se adicionó 10 µL de lisozima y se llevó a baño maría por 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se adicionó 9 µL de proteinasa K 20 mg/mL y se dejó en baño maría por 1 hora a 37°C. Luego, se adicionó 100 µL de NaCl 5 M, se agitó

en un vortex por 30 s, se agregó 80  $\mu$ L de CTAB, se agitó en un vortex por 30 s y se dejó en baño maría por 20 min a 65°C. A continuación, se agregó 700  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 25 min. El sobrenadante que se obtuvo se adicionó a un vial junto a 1  $\mu$ L de RNAsa 20 mg/mL y se llevó a incubar a 37°C por 1 hora. Seguido a esto, se adicionó 600  $\mu$ L de cloroformo, se mezcló en un vortex por 30 s y se llevó a centrifugar a 10000 rpm por 15 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a un vial con 300  $\mu$ L de alcohol isopropílico frío, se llevó a -20°C por 14 horas y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min. Se eliminó el sobrenadante, se adicionó 200  $\mu$ L de etanol al 70% frío y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se eliminó, se dejó secar a temperatura ambiente por 12 horas, se adicionó 100  $\mu$ L de tampón TE 1X y se almacenó a -20°C (Burbano et al., 2017).

### **7.3.2 Electroforesis de ácidos nucleicos.**

Se preparó un gel de agarosa 1%, se adicionó 20  $\mu$ L de EZ-Vision y se colocó en una cámara de electroforesis para ser sumergido en un tampón TAE 1X. Las muestras se prepararon mezclando 2  $\mu$ L de azul de bromofenol y 8  $\mu$ L de ADN, los cuales se adicionaron a cada pozo el gel y se sometieron a 70 voltios por 1 hora. Se usó como marcador de tamaño molecular lambda Hind (Burbano et al., 2017).

### **7.3.3 Amplificación del gen ribosomal 16S.**

Se realizó una amplificación del ARNr gen 16S por PCR utilizando los cebadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) Y 1041R (CGGTGTGTACAAGACCC). Para esto, se adicionó en un tubo Eppendorf 18  $\mu$ L de agua ultrapura estéril, 25  $\mu$ L 2X PCR Taq MasterMix, 2  $\mu$ L de cebador 27F, 2  $\mu$ L de cebador 1041F y 3  $\mu$ L de ADN. La solución se mezcló y se adicionó en un tubo de PCR. Las condiciones de termociclado fueron a 95°C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 2 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min y una extensión final de 72 °C por 10 min. La calidad de los amplificados se verificó por electroforesis en gel agarosa a 1%, según lo descrito en el numeral 7.3.2, usando como marcador molecular 1Kb ladder (Olowe et al., 2022; Burbano et al., 2017).

### 7.3.4 Secuenciación y análisis.

Las secuencias amplificadas se enviaron al laboratorio SSIGMOL de la Universidad Nacional para su secuenciación. Una vez que se obtuvieron las secuencias se visualizaron y se editaron en el software BioEdit Sequence Alignment Editor.

Las secuencias obtenidas después del proceso de edición se compararon en la base de datos GenBank (Burbano et al., 2017).

## 7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el objetivo dos, para la prueba de antagonismo dual se aplicó un diseño completamente al azar (Tabla 3), para un total de 98 tratamientos por hongo evaluado (*Fusarium spp.* SH3 y *Fusarium spp.* SH26) y como variable de respuesta se analizó el PICR.

Tabla 3. Diseño experimental para la prueba de antagonismo dual.

Prueba de antagonismo dual de aislados bacterianos contra <i>Fusarium spp.</i>	
Factor(es)	98 bacterias aisladas

En las pruebas de temperatura y pH (Tabla 4) se aplicó un diseño factorial 2X2 (dos hongos, dos temperaturas) y 2X3 (dos hongos, tres pH), respectivamente. La variable de respuesta en cada experimento fue el PICR.

Tabla 4. Diseño experimental para las pruebas de temperatura y pH.

Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra <i>Fusarium spp.</i>		
Factor(es)	<i>Fusarium spp.</i> SH3	20 °C
	<i>Fusarium spp.</i> SH26	10 °C
Efecto del pH sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra <i>Fusarium spp.</i>		
Factor(es)	<i>Fusarium spp.</i> SH3	4,0

<i>Fusarium spp.</i> SH26	5,0
	6,0

En cuento, al antagonismo por compuestos volátiles se hizo un diseño completo al azar, mientras que para evaluar la inhibición por compuestos no volátiles se realizó un diseño 2x3 (dos hongos, tres tiempos), como presenta la Tabla 5. La variable de respuesta en cada experimento fue el PICR.

Tabla 5. Diseño experimental para las pruebas de compuestos volátiles y no volátiles.

Antagonismo por compuestos volátiles		
Factor(es)	<i>Fusarium spp.</i> SH3	
	<i>Fusarium spp.</i> SH26	
Antagonismo por compuestos no volátiles		
	<i>Fusarium spp.</i> SH3	0 h
Factor(es)	<i>Fusarium spp.</i> SH26	12 h
		24 h

En todos los casos se aplicó un análisis de varianza con un 95% de confiabilidad (ANOVA) como método de terminación de diferencias significativas. Las diferencias de los valores de medias fueron comparadas mediante la prueba de Fisher; los resultados se presentan como valor promedio  $\pm$  desviación estándar (Lopez, S., & Victoria, D., 2016). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat versión 2020I.

## 8. RESULTADOS

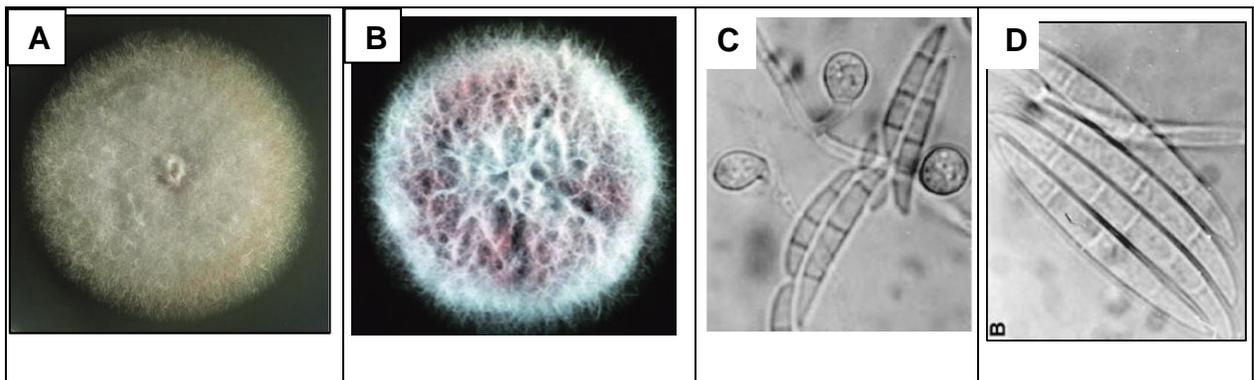
### 8.1 AISLAMIENTO DE *Fusarium spp.* PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE CULTIVOS DE FRESA

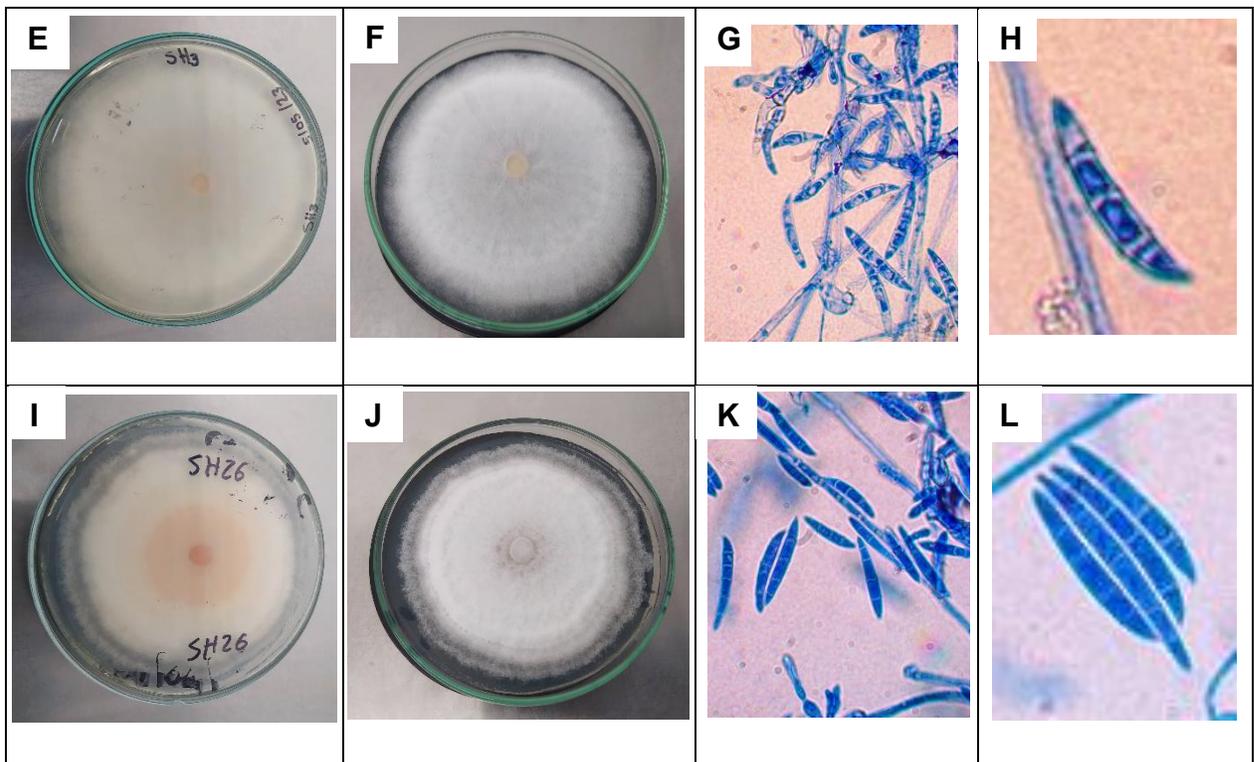
Con base a las muestras extraídas de las dos fincas se logró la purificación de 84 aislados fúngicos (47 de suelo y 37 de raíz), de los cuales se seleccionaron aquellos con morfología macroscópica similar a *Fusarium spp.* (micelio abundante, textura algodonosa y color blanco), obteniendo finalmente 36 hongos con estas características, 21 provenientes de muestras de suelo y 15 de raíz.

#### 8.1.1 Descripción macroscópica y microscópica de *Fusarium spp.*

La tinción con azul de lactofenol realizada a las 36 cepas mostró que los aislados SH3 y SH26 presentaban características propias de *Fusarium spp.*, como macroconidios ligeramente curvos de uno a cinco septos y microconidios en forma ovoide lo que coincide con lo reportado por Morales-Mora, L. A., et al (2020). Además, estos hongos en su caracterización macroscópica presentaban un color blanco en su parte superior y en su reverso, con una topografía umbonada y una textura algodonosa (Figura 1).

Figura 1. Aislados de *Fusarium spp.* procedentes de muestras de suelo de plantas enfermas de fresa





(A, B)- Cara superior de *Fusarium spp.* tomado del manual de Campbell et al (2013); (C, D) Macroconidias de *Fusarium spp.* tomado del manual de Watanabe, T. (2010); (E)-SH3 reverso; (F)-SH3 cara superior; (G, H)- SH3 macroconidias; (I)-SH26 reverso; (J)-SH26 cara superior; (K, L)- SH26 macroconidias.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, el aislamiento de hongos fue superior en las muestras de suelo rizosférico que en las de raíz, este resultado está en línea con los estudios de Yang, W. T., et al (2023), Wang, S. et al, (2022), y Wu, Z., et al (2015) que obtuvieron una mayor diversidad de hongos en el suelo de la rizósfera que en las raíces de las plantas.

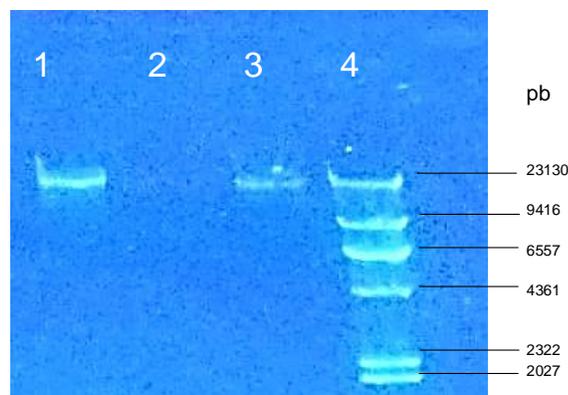
Los aislados de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 se encontraron en muestras de suelo, sin embargo, no se encontraron en las muestras de raíz. Esto concuerda con los autores Yang, W. T., et al (2023), los cuales en su estudio sobre diversidad microbiana en suelo de *Psammosilene tunicoides*, encontraron *Fusarium spp.* solo en muestras de suelo rizosférico, además, autores como Pastrana, A., et al (2016) reportan que han aislado *Fusarium spp.* de plantas de fresa que han muerto por pudrición de la corona y raíz, más no han recuperado *Fusarium spp.* de plantas con síntomas de esta enfermedad que permanezcan vivas, esto podría deberse al ciclo de la enfermedad, en el que puede estar en el suelo circundante en algunas fases del ciclo y en otras en la planta (gob., 2020); esto es similar a lo encontrado en esta investigación, puesto que al momento del

muestreo las plantas seleccionadas presentaban síntomas de la enfermedad, pero no estaban 100% marchitas.

### 8.1.2 Identificación taxonómica de los *Fusarium spp.* mediante el gen ARNr 28S.

En la Figura 2 se presenta el resultado del ADN total obtenido de *Fusarium spp.*, se puede apreciar que en el carril 1 y 3 se obtuvo una banda definida con fluorescencia intensa ubicadas cerca de la banda de mayor tamaño molecular en el patrón de referencia, siendo 23130 pb.

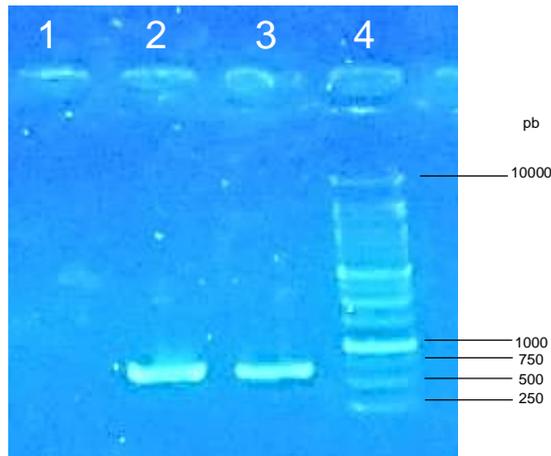
Figura 2. Verificación de la calidad del ADN total de *Fusarium spp.*



(1)- *Fusarium spp.* SH3; (2)- Agua; (3)- *Fusarium spp.* SH26; (4)- Marcador de tamaño molecular lambda Hind III

En cuanto al gen amplificado mediante PCR (Figura 3), se encontró fragmentos de aproximadamente 750 pb para cada cepa, con lo que se puede concluir que se obtuvieron amplificados esperados del gen 28S.

Figura 3. Verificación de la calidad del ADN amplificado de *Fusarium spp.*



(1)-Agua; (2)- *Fusarium spp.* SH3; (3)- *Fusarium spp.* SH26; (4)- Marcador de tamaño molecular 1Kb ladder

En la comparación con la base de datos GenBank de las dos secuencias, se encontró que pertenecían con un 99,24% de certeza que la identidad de la cepa de SH3 corresponde a *Fusarium incarnatum*. En cuanto a la cepa de SH26, se identificó como *Fusarium equiseti*, con un porcentaje de identidad del 99,81%. Por lo tanto, podemos concluir que las cepas aisladas corresponden al género *Fusarium spp.*, sin embargo, para corroborar la especie se recomienda amplificar otras regiones del gen 28S utilizando los primer ITS 1 y ITS 4.

Las especies de *Fusarium spp.* son conocidas como patógenos de plantas, como reporta Zhang, Y. et al (2022) en su estudio sobre patogenicidad fúngica asociados a podredumbre en fresa, encontraron que la virulencia por *F. oxysporum* fue del 63,17% y un 52,38% por *F. equiseti*, Así mismo, *F. equiseti*, también se ha reportado como agentes causantes de la pudrición de raíz en la soja y papa (Lu, C. et al, 2015; Zhang, X. et al, 2022), esto respalda los resultados obtenidos en el presente estudio.

El aislamiento de *F. incarnatum* en la presente investigación, va en línea por lo encontrado por Li, Mr. Z. et al (2023), quien reportó en su estudio sobre patogenicidad que *F. incarnatum* es uno de los agentes causales de la pudrición de la fresa en la provincia de Shandong, China, así mismo, autores como Chen, P. H. et al (2018), en su estudio de antagonismo utilizaron patógenos de la fresa como *Botrytis cinerea* (cepa JYC2142), *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium incarnatum*. Otros autores también lo han reportado como patógeno de papa y melón (Zhang, X. et al, 2022; Liu, J. et al, 2023).

## **8.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRESENTES EN SUELO Y RAÍZ DE CULTIVOS DE FRESA**

Los resultados del aislamiento bacteriano de las dos fincas, alcanzó un total de 98 morfotipos, de los cuales 69 corresponden a muestras de suelo y 29 a muestras de raíz.

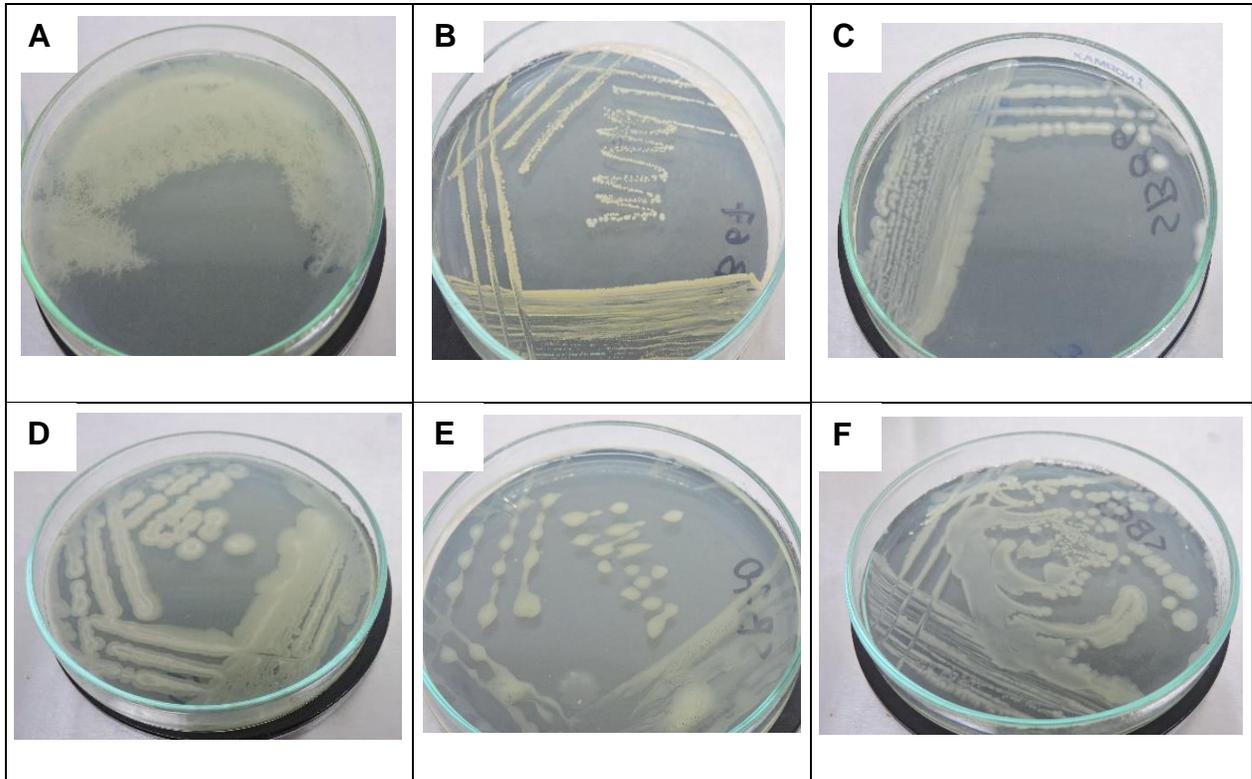
Por otra parte, en este trabajo se observó un mayor número de aislamiento en muestras de suelo en comparación con las de raíz, esto concuerda con lo obtenido por los autores Yang, W. T., et al (2023), Wang, S. et al, (2022), Chávez-Díaz, I. F. (2020), Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2017) y Wu, Z., et al (2015), quienes reportan que el suelo de la rizosfera contiene una mayor población y diversidad microbiana que la de raíz, lo anterior puede deberse a que las raíces de las plantas secretan exudados que mejoran el entorno microecológico del suelo de la rizosfera y desempeñan un papel positivo en el aumento del número y la diversidad de microorganismos. En contraste, las bacterias endófitas requieren de una condición más específica para adaptarse y permanecer en ese ambiente controlado del interior de la planta, como, por ejemplo, la estrecha relación planta-microorganismo, el tipo de planta y la competencia con otros microorganismos; en términos generales se considera que la composición de los microorganismos en el interior de la planta aparentemente tienden a ser menos compleja que la que se encuentra en el suelo cercano (Wang, S. et al, 2022).

### **8.2.1 Descripción macroscópica y microscópica de bacterias-**

En el Anexo 1 se encuentra consignada la información de las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos obtenidos en muestras de suelo rizosférico de las dos fincas.

En cuanto a la caracterización macroscópica, se encontró que un 65% presentaban forma circular, un 62% borde entero, un 78% elevación plana y un 61% superficie lisa. Además, predominó el color blanco y crema, en un 42 y 39%, respectivamente. Respecto a la propiedad óptica el 55% era brillante. En la Figura 4 se muestra la morfología macroscópica de algunos de los aislados obtenidos.

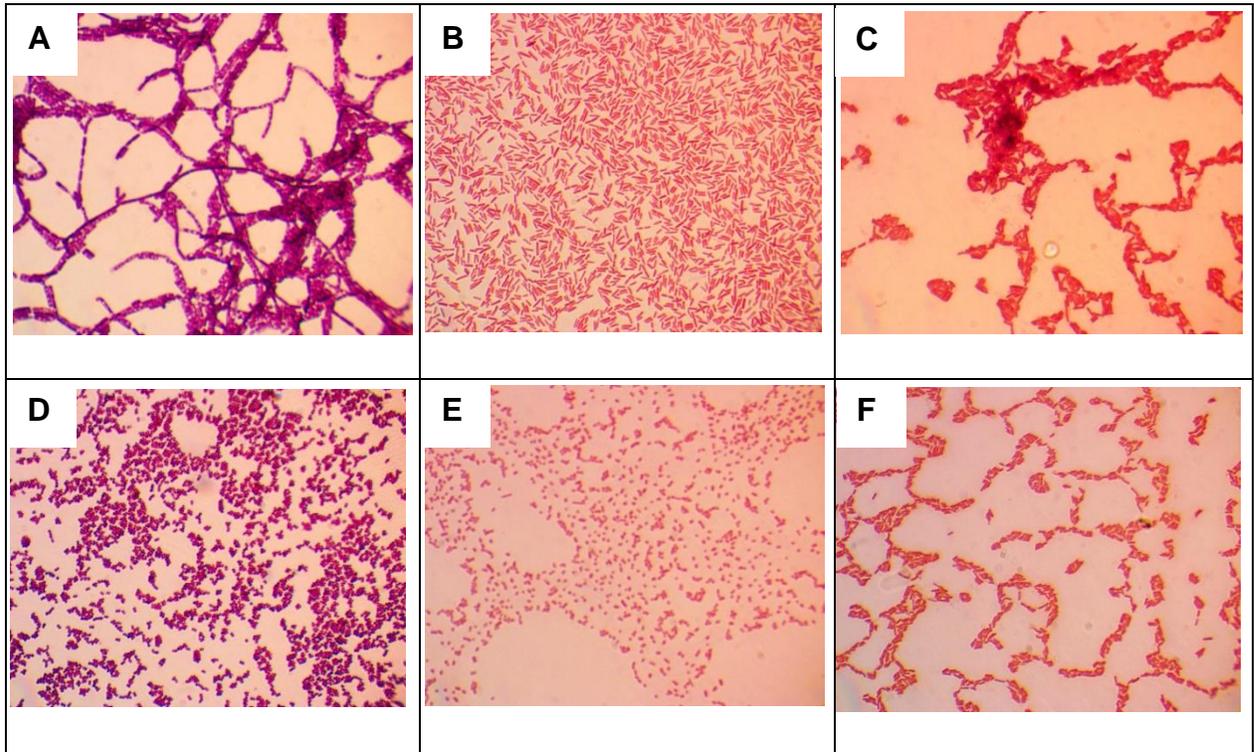
Figura 4. Morfología macroscópica de algunos de los aislados obtenidos de muestras de suelo de plantas enfermas de fresa



(A)-SB76;(B)- SB67; (C)- SB86;(D)- SB83;(E)- SB27;(F)- SB95

Respecto a la caracterización microscópica, se observaron las siguientes morfologías: un 92,8% bacilos y un 7,2% cocos. En cuanto a los atributos microscópicos de los aislados, mostraron que los bacilos Gram positivos son el grupo mayoritario en las muestras de suelo, con un 64%, seguido de esto están los bacilos Gram negativos con el 29% y en menor número se obtuvo cocos Gram positivos representando el 7% del total de aislados en muestras de suelo. En la Figura 5 se muestra la morfología microscópica de algunos de los aislados obtenidos.

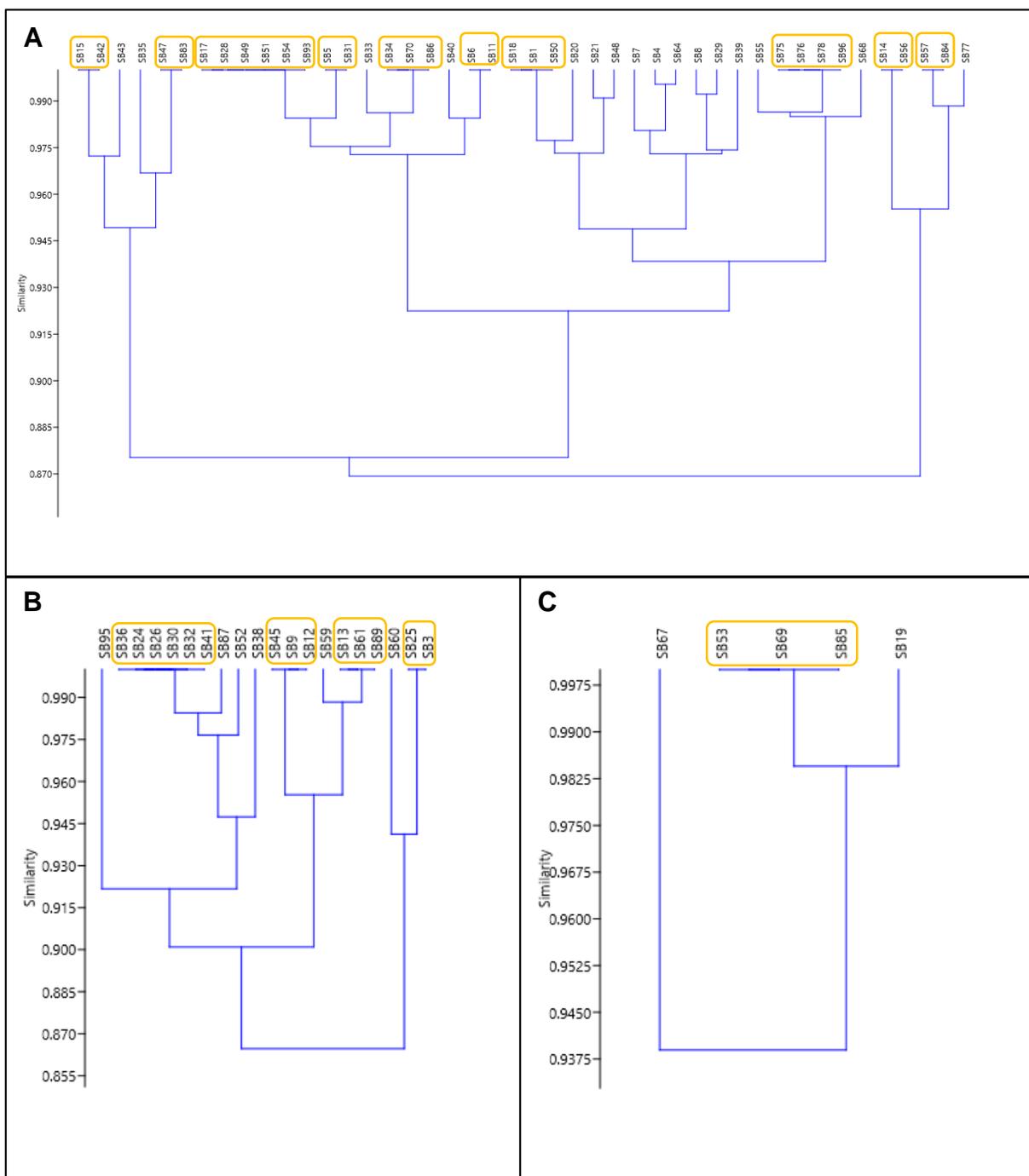
Figura 5. Tinción de Gram en aislados bacterianos de suelo



(A)- SB11 es un bacilo Gram positivo; (B)- SB24 es un bacilo Gram negativo; (C)- SB3 es un bacilo Gram negativo; (D)- SB19 es un coco Gram positivo; (E)- SB53 es un coco Gram positivo; (F)- SB36 es un bacilo Gram negativo.

Por otra parte, se realizó un análisis de clúster (Figura 6) basado en las características macroscópicas de los bacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos y cocos Gram positivos. A partir de los atributos culturales de los bacilos Gram positivos, se encontró la formación de 10 grupos con un coeficiente de similitud del 100%, cada conjunto estaba compuesto entre 2 a 6 aislados bacterianos, en cuanto al grupo más grandes fueron los aislados SB17, SB28, SB49, SB51, SB54 y SB93 (Forma: circular. Borde: entero. Elevación: plana. Superficie: lisa. Propiedad óptica: brillante. Color: crema). En cuanto a los bacilos Gram negativos, se formaron 4 conjuntos, con 2 a 6 aislados, siendo el más grande el de las morfologías SB24, SB26, SB30, SB32, SB36, SB41 (Forma: circular. Borde: entero. Elevación: plana. Superficie: lisa. Propiedad óptica: Brillante. Color: crema). Respecto a los cocos Gram positivos hubo un solo grupo constituido por los aislados SB53, SB69 y SB85 (Forma: circular. Borde: entero. Elevación: plana. Superficie: lisa. Propiedad óptica: Brillante. Color: crema).

Figura 6. Análisis de clúster de los aislados bacterianos de muestras de suelo.

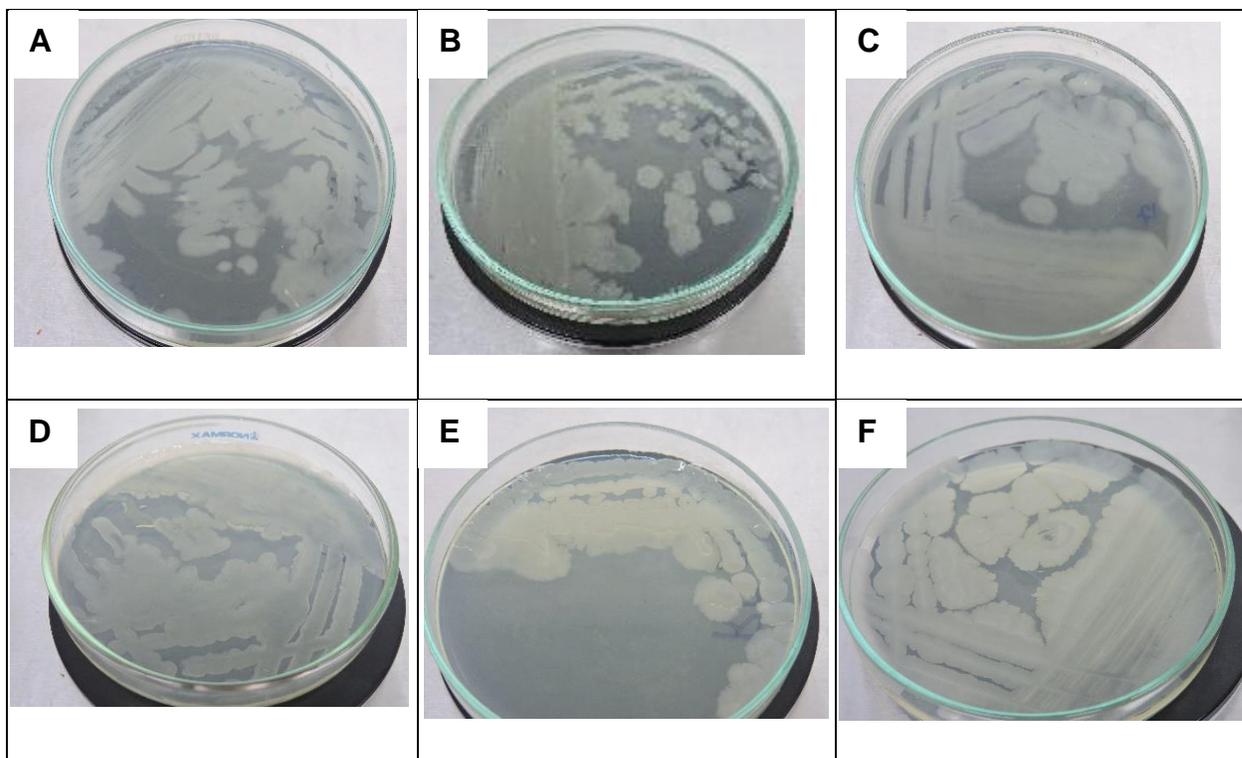


(A)- Bacilos Gram positivo; (B)- Bacilo Gram negativo; (C)- Cocos Gram positivo

En el Anexo 2 se encuentra consignada la información de las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos obtenidos en muestras de raíz de las dos fincas.

Referente a la caracterización macroscópica, se encontró que el 65% presentaban forma circular y un 45 y 41%, borde ondulado y entero, respectivamente. Además, predominó la elevación plana con un 86%, la propiedad óptica opaca con un 72% y el color crema en un 62%. En cuanto a la superficie el 41 y 38%, fue áspera y rugosa, correspondientemente. En la Figura 7 se muestra la morfología macroscópica de algunos de los aislados obtenidos.

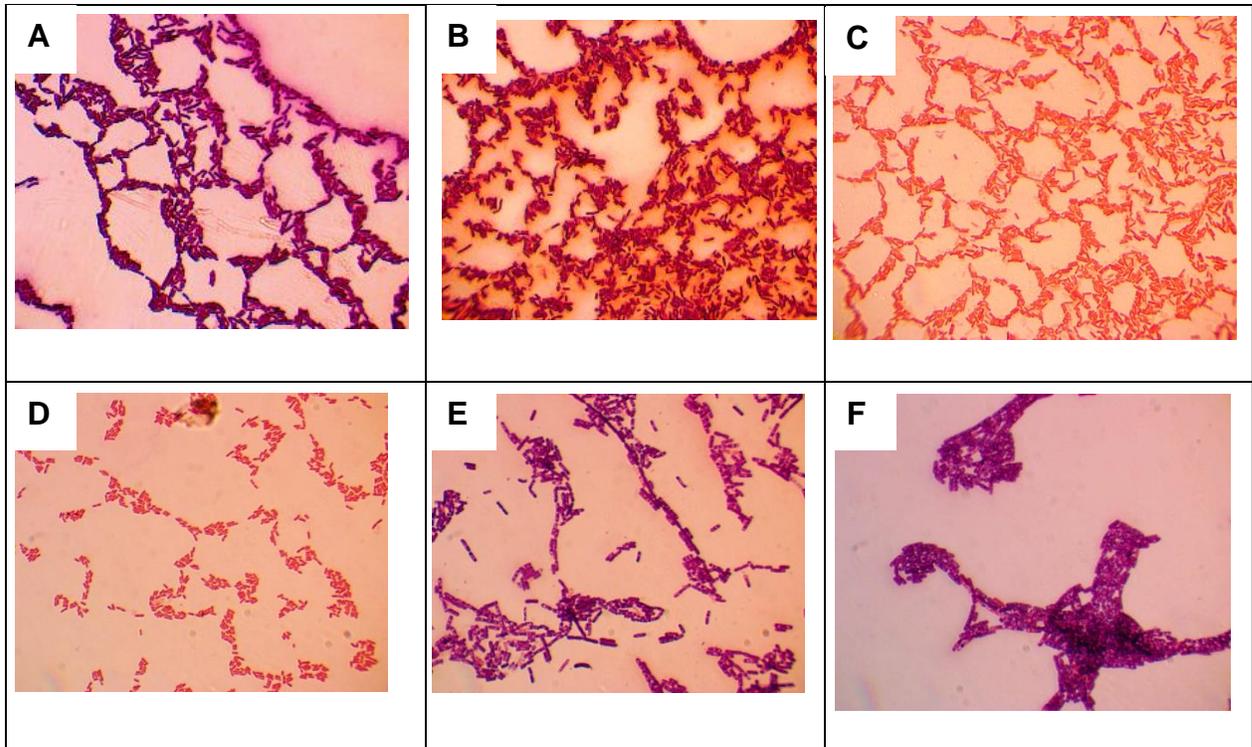
Figura 7. Morfología macroscópica de algunos de los aislados obtenidos de muestras de raíz de plantas enfermas de fresa



(A)- RB21;(B)- RB27;(C)- RB22;(D)- RB31;(E)- RB24;(F)- RB15.

En relación a la caracterización microscópica, todas las morfologías observadas fueron bacilos, con un 79% bacilos Gram positivos y un 21% en bacilos Gram negativos. En la Figura 8 se muestra la morfología microscópica de algunos de los aislados obtenidos.

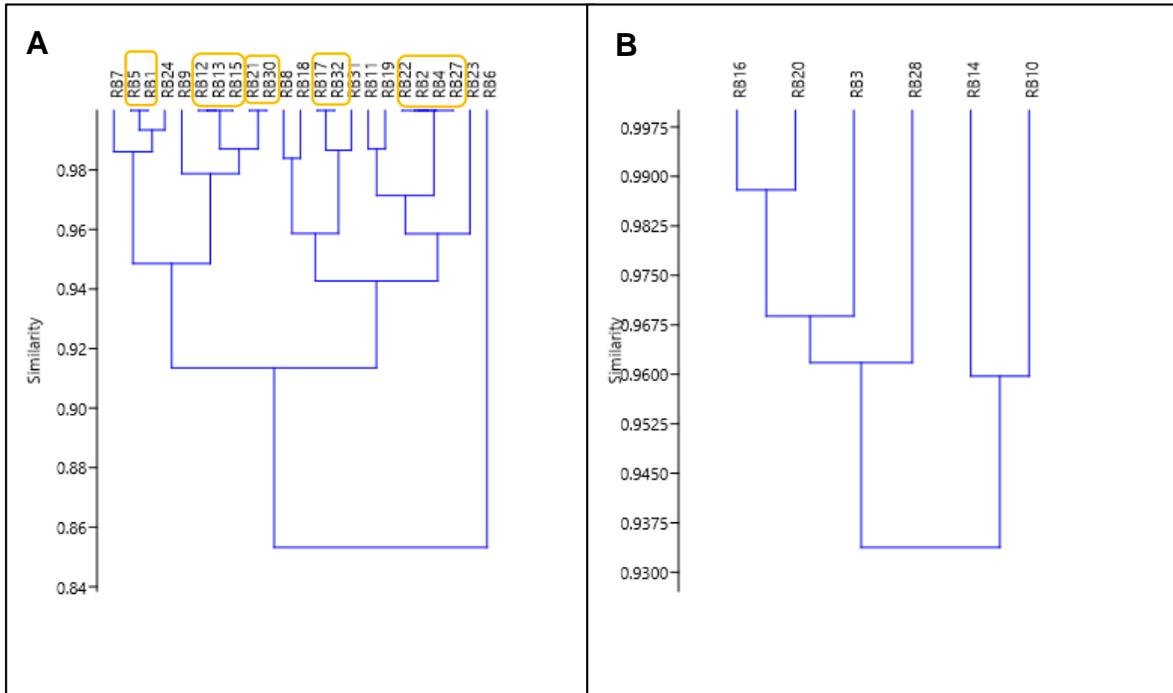
Figura 8. Tinción de Gram en aislados bacterianos de raíz



(A)- RB1 es un bacilo Gram positivo; (B)- RB30 es un bacilo Gram positivo; (C)- RB28 es un bacilo Gram negativo; (D)- RB20 es un bacilo Gram negativo; (E)- RB17 es un bacilo Gram positivo; (F)- RB15 es un bacilo Gram positivo.

El análisis de clúster (Figura 9.) de los bacilos Gram Positivos y Gram negativos aislados de raíz, se encontró solamente formación de grupos en los Gram positivos, con un total de 5 grupos con un coeficiente de similitud del 100%, formados de 2 a 4 morfologías similares por grupo, siendo el grupo más grande el conformado por los aislados RB22, RB2, RB4 y RB27 (Forma: circular. Borde: entero. Elevación: plana. Superficie: lisa. Propiedad óptica: brillante. Color: crema).

Figura 9. Análisis de clúster de los aislados bacterianos de muestras de raíz.



(A)- Bacilos Gram positivo; (B)- Bacilo Gram negativo

Los mayores aislamientos de bacterias pertenecen a Gram positivas, seguidas de bacterias Gram negativas en muestras de suelo rizosférico y raíz, estos resultados son coherentes con lo reportado por Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2017), quienes encontraron que el 53% de los aislados eran Gram positivas y el 47% Gram negativas. Así mismo, Smalla, K., et al (2001) reportaron en su estudio de caracterización bacteriana mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, que 6 de cada 10 bandas dominantes extraídas de los patrones de la rizósfera se relacionaban con bacterias Gram positivas; esto puede darse debido a que géneros como *Bacillus* y *Paenibacillus*, pueden formar esporas que las hacen resistentes a condiciones adversas (Corrales Ramírez, L. C., et al, 2014).

### 8.2.2 Prueba de antagonismo dual de aislados bacterianos contra *Fusarium spp.*

La tabla de frecuencias (Tabla 6) elaborada con los resultados del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de los aislados bacterianos obtenidos frente a *Fusarium spp.* SH3 mostró que la inhibición mínima estuvo entre 0 a 8,6% realizada por 4 aislados,

mientras que 37 morfotipos tuvieron una inhibición superior a 51,7% y la mayor inhibición estuvo en un rango entre 60,3 a 68,9% (13 bacterias).

Tabla 6. Tabla de frecuencias de *Fusarium spp.* SH3

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
SH3	1	0,0%	8,6%	4,3%	4	4%	4	4%
SH3	2	8,6%	17,2%	12,9%	12	12%	16	16%
SH3	3	17,2%	25,8%	21,5%	6	6%	22	22%
SH3	4	25,8%	34,4%	30,1%	11	11%	33	34%
SH3	5	34,4%	43,1%	38,8%	11	11%	44	45%
SH3	6	43,1%	51,7%	47,4%	17	17%	61	62%
SH3	7	51,7%	60,3%	56,0%	24	25%	85	87%
SH3	8	60,3%	68,9%	64,6%	13	13%	98	100%

(LI)- Límite inferior del intervalo de clase; (S)- Límite superior del intervalo de clase; (MC)-Marca de clase; (FA)- Frecuencia absoluta; (FR)- Frecuencia relativa; (FAA)- Frecuencia absoluta acumulada; (FRA)- Frecuencia relativa acumulada.

El análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 contra las bacterias aisladas mostró diferencias estadísticas significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 3).

Al confirmarse que existen diferencias significativas, se hizo un análisis de comparación LSD Fisher, obteniendo un total de 54 grupos (Anexo 4). Posteriormente, se hizo un segundo análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 7), en donde se eligieron 13 aislados con un PICR promedio igual o superior al 60%, en donde el aislado SB68 obtuvo el PICR más alto, mientras que SB14 fue el más bajo, siendo 68,9 y 60,3%, respectivamente.

Tabla 7. Análisis de comparación LSD Fisher de *Fusarium spp.* SH3

BACTERIAS	Variable	Media
SB68	PICR	68,9% ± 0,01 <sup>C</sup>
SB93	PICR	66,7% ± 0,02 <sup>BC</sup>
RB8	PICR	65,8% ± 0,02 <sup>ABC</sup>
SB89	PICR	65,8% ± 0,06 <sup>ABC</sup>
SB85	PICR	64,0% ± 0,02 <sup>ABC</sup>

RB7	PICR	63,1% ± 0,02 <sup>AB</sup>
SB69	PICR	63,1% ± 0,02 <sup>AB</sup>
SB77	PICR	63,1% ± 0,08 <sup>AB</sup>
RB5	PICR	62,2% ± 0,03 <sup>AB</sup>
RB6	PICR	62,2% ± 0,00 <sup>AB</sup>
SB17	PICR	61,4% ± 0,04 <sup>AB</sup>
RB1	PICR	60,8% ± 0,01 <sup>A</sup>
SB14	PICR	60,3% ± 0,01 <sup>A</sup>

En cuanto al *Fusarium spp.* SH26, la tabla de frecuencias (Tabla 8) mostró que la inhibición más baja fue entre 0 a 8,6% dado por 2 bacterias, en cambio 49 aislados tuvieron un PICR mayor a 51,4% y el rango más alto fue entre 59,9 a 68,5% constituido por 12 morfotipos.

Tabla 8. Tabla de frecuencias de *Fusarium spp.* SH26

Variable	Clase	LI	LS	MC	FA	FR	FAA	FRA
SH26	1	0,0%	8,6%	4,3%	2	2%	2	2%
SH26	2	8,6%	17,1%	12,8%	2	2%	4	4%
SH26	3	17,1%	25,7%	21,4%	8	8%	12	12%
SH26	4	25,7%	34,3%	30,0%	10	10%	22	22%
SH26	5	34,3%	42,8%	38,5%	12	12%	34	35%
SH26	6	42,8%	51,4%	47,1%	15	15%	49	50%
SH26	7	51,4%	59,9%	55,7%	37	38%	86	88%
SH26	8	59,9%	68,5%	64,2%	12	12%	98	100%

(LI)- Límite inferior del intervalo de clase; (S)- Límite superior del intervalo de clase; (MC)-Marca de clase; (FA)- Frecuencia absoluta; (FR)- Frecuencia relativa; (FAA)- Frecuencia absoluta acumulada; (FRA)- Frecuencia relativa acumulada.

El análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH26 contra las bacterias aisladas mostró diferencias estadísticas significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 3).

Dado que existen diferencias significativas, se hizo un análisis de comparación LSD Fisher para *Fusarium spp.* SH26 con un total de 50 grupos (Anexo 5), con esto, se hizo un segundo análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 9) con 12 aislados bacterianos

con un PICR promedio igual o superior al 60%, siendo PICR más bajo el de SB54 (60,5%) y el más alto el de SB14 (68,5%).

Tabla 9. Análisis de comparación LSD Fisher de *Fusarium spp.* SH26

Bacteria	Variable	Media
SB14	SH26	68,5% ± 0,03 <sup>C</sup>
RB9	SH26	68,1% ± 0,01 <sup>BC</sup>
SB40	SH26	66,7% ± 0,05 <sup>ABC</sup>
RB12	SH26	65,7% ± 0,07 <sup>ABC</sup>
RB6	SH26	64,2% ± 0,03 <sup>ABC</sup>
SB56	SH26	63,9% ± 0,06 <sup>ABC</sup>
RB10	SH26	63,0% ± 0,04 <sup>ABC</sup>
RB11	SH26	62,0% ± 0,06 <sup>ABC</sup>
SB47	SH26	61,4% ± 0,02 <sup>AB</sup>
SB24	SH26	61,1% ± 0,03 <sup>A</sup>
SB15	SH26	60,5% ± 0,00 <sup>A</sup>
SB54	SH26	60,5% ± 0,03 <sup>A</sup>

El análisis de varianza y la prueba LSD Fisher mostraron que los aislados que presentaron el mayor PICR fueron SB68(68,9%) y SB14(68,5%) para las cepas de *Fusarium spp.* SH3 y SH26, respectivamente. Es importante mencionar que el aislado SB14 presentó PICR de 60,3% para *Fusarium spp.* SH3, mientras que SB68 obtuvo un 52,2% contra *Fusarium spp.* SH26. Teniendo en cuenta, que se busca que los biocontroladores tengan buena propiedad antagonista contra el fitopatógeno *Fusarium spp.*, se optó por SB14 y SB68 para las demás pruebas de esta investigación.

Los aislados seleccionados corresponden a bacilos Gram positivos. De acuerdo a la caracterización realizada en todo el estudio se obtuvieron 67 bacilos Gram positivos aislados, los reportes de literatura mencionan que entre los bacilos Gram positivos más estudiados está el género *Bacillus spp.*, destacándose especies como *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. simplex*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* y *B. cereus*, las cuales se han reportado como activas contra *Fusarium spp.* (Patel, R., et al, 2022). De acuerdo a los resultados de este estudio 18 aislados bacilos Gram positivos presentaron un rango de PICR entre 60,3 a 68,9%, esto está cercano a lo reportado por Chen, Y., Xu, et al (2020) en su estudio reportaron que los mejores PICR obtenidos de sus aislados bacterianos del

suelo de rizosfera de fresa sana, fueron del 75,7 y 70,2%, para las cepas *Bacillus licheniformis* y *Bacillus methylotrophicus*, respectivamente. De igual forma se acerca a los reportado por Elbouazaoui, A., et al (2022) quienes encontraron que *Bacillus subtilis* inhibió a *Fusarium oxysporum f.sp ciceris* en un 75%.

En cuanto a los bacilos Gram negativos, los más estudiados para el control de *Fusarium spp.* son *Serratia spp.*, *Burkholderia spp.* y *Pseudomonas spp.* (Li, Y., et al, 2022). En este estudio se encontraron 26 aislados Gram negativos, de los cuales 3 morfologías presentaron un rango de PICR entre 61,1 a 65,8%, lo cual está por debajo de lo reportado por Nagraj, D., et al (2021) quienes encontraron que *Pseudomonas fluorescens VUPf506* puede reducir el crecimiento de *F. solani* en un 79,8%, y la *Pseudomonas solanaceacum* contra *F. verticillioides* un 70%.

Respecto a cocos Gram positivos, en este estudio se aislaron 26 Gram Positivos, presentando 2 bacterias un rango de PICR entre 63,1 a 64,0%, siendo menor a lo reportado por Nagraj, D., et al (2021) quienes encontraron un 89% de inhibición de *Pediococcus pentosaceus* contra *F. verticillioides*.

### 8.2.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra *Fusarium spp.*

Para el aislado SB14 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes temperaturas mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 6). El análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 10), mostró que los PICR más altos fueron los obtenidos a 20°C y no se encontró diferencias a 10°C.

Tabla 10. Análisis de comparación LSD Fisher del efecto de la temperatura sobre el antagonismo de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

BACTERIA	VARIABLE	MEDIA
SB14 20°C SH3	PICR	60,0% ± 0,02 <sup>B</sup>
SB14 20°C SH26	PICR	56,2% ± 0,03 <sup>B</sup>
SB14 10°C SH3	PICR	25,7% ± 0,02 <sup>A</sup>
SB14 10°C SH26	PICR	25,0% ± 0,05 <sup>A</sup>

En cuanto al aislado SB68 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes temperaturas mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 7). El análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 11), mostró que los PICR más alto fue contra *Fusarium spp.* SH3 a 20°C, mientras que para los otros grupos el comportamiento fue similar.

Tabla 11. Análisis de comparación LSD Fisher del efecto de la temperatura sobre el antagonismo de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

BACTERIA	VARIABLE	MEDIA
SB68 20°C SH3	PICR	34,5% ± 0,03 <sup>B</sup>
SB68 10°C SH3	PICR	21,5% ± 0,03 <sup>A</sup>
SB68 20°C SH26	PICR	21,5% ± 0,02 <sup>A</sup>
SB68 10°C SH26	PICR	17,2% ± 0,02 <sup>A</sup>

Teniendo en cuenta al PICR alcanzado a la temperatura de 28°C (Ítem 8.2.2) se puede apreciar que hay un efecto más marcado en la temperatura contra el aislado SB68, puesto que hay una disminución notoria del efecto antagónico pasando de 68,9 y 52,2% a 34,5 y 21,5%, mientras que para el aislado SB14 de 60,3 y 68,5% paso solo a 60,0 y 56,2% contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a 20°C, respectivamente. Sin embargo, los aislados bacterianos presentaron capacidad antagonista en todos los casos, siendo esto un factor a resaltar, dado que el municipio de Silvia cuenta con un rango de temperatura media entre 12°C a 21°C (Alcaldía Municipal de Silvia, 2018).

Por otra parte, se ha reportado que la producción de metabolitos con potencial antagónico depende de las condiciones de crecimiento del microorganismo, entre las cuales se encuentra la temperatura (Jiménez-Delgadillo, R., et al 2018; Ran, J., et al 2023). A bajas temperaturas se afecta la utilización de fuentes de carbono y energía, generando alteración del metabolismo (Vehapi, M., et al, 2023), como se ve reflejado en este estudio, la actividad antagónica de las bacterias fue menor a bajas temperaturas. Asimismo, Ran, J., et al (2023) en su estudio sobre el antagonismo de *Paenibacillus polymyxa* hacia *Fusarium spp.* encontró que a medida que disminuye la temperatura baja la capacidad inhibitoria frente al patógeno, respaldando los resultados del presente estudio.

### 8.2.4 Efecto del pH sobre la actividad antagónica de las bacterias aisladas contra *Fusarium spp.*

Para el aislado SB14 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes pH mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 8). El análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 12), muestra la formación de dos grupos, donde la menor inhibición se encontró contra *Fusarium spp.* SH3 a pH 4, mientras que los otros ensayos se muestran que el efecto en el crecimiento radial fue mínimo.

Tabla 12. Análisis de comparación LSD Fisher del efecto del pH sobre el antagonismo de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

Bacteria	Variable	Media
SB14 pH= 5 SH26	PICR	59,1% ± 0,03 <sup>B</sup>
SB14 pH= 5 SH3	PICR	58,3% ± 0,04 <sup>B</sup>
SB14 pH= 4 SH26	PICR	57,3% ± 0,05 <sup>B</sup>
SB14 pH= 6 SH3	PICR	56,6% ± 0,03 <sup>B</sup>
SB14 pH= 6 SH26	PICR	53,5% ± 0,02 <sup>B</sup>
SB14 pH= 4 SH3	PICR	44,8% ± 0,06 <sup>A</sup>

Respecto al aislado SB68 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes pH mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 9). El análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 13), presenta que el PICR más alto fue contra *Fusarium spp.* SH3, seguido de *Fusarium spp.* SH26, observando que la mejor inhibición se dio a pH 6 en ambos casos, seguido a pH 5 y por último a pH 4.

Tabla 13. Análisis de comparación LSD Fisher del efecto del pH sobre el antagonismo de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

Bacteria	Variable	Media
SB68 pH= 6 SH3	PICR	38,4% ± 0,02 <sup>D</sup>
SB68 pH= 5 SH3	PICR	20,9% ± 0,06 <sup>C</sup>
SB68 pH= 4 SH3	PICR	17,2% ± 0,04 <sup>BC</sup>
SB68 pH= 6 SH26	PICR	15,7% ± 0,02 <sup>BC</sup>

SB68 pH= 5 SH26	PICR	12,4% ± 0,00 <sup>AB</sup>
SB68 pH= 4 SH26	PICR	9,3% ± 0,00 <sup>A</sup>

Teniendo en cuenta al PICR alcanzado en el Ítem 8.2.2 se puede apreciar que hay un efecto más marcado del pH contra el aislado SB68, puesto que hay una disminución notoria del efecto antagónico pasando de 68,9 y 52,2% a estar entre 9,3 a 38,4%, mientras que para el aislado SB14 de 60,3 y 68,5% paso solo a 44,8 y 59,1% contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26, respectivamente. Adicional a eso, se encontró que en todos los casos se obtuvo capacidad inhibitoria, siendo esto un factor a resaltar, dado que el cultivo de fresa necesita suelos medianamente ácidos, con valores de pH entre 5,7 y 6,5 (Flórez Faura, R., & Mora Cabeza, R. A., 2010).

Por otra parte, se ha reportado que el pH puede influir en el crecimiento bacteriano y la actividad funcional de los agentes de biocontrol bacteriano, cambiando su capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos (Jiménez-Delgadillo, R., et al, 2018; Chowdhury, N., et al, 2022), esto podría explicar por qué el PICR variaba según el pH contra el mismo mi *Fusarium spp.*

Así mismo, Ran, J., et al (2023) en su estudio sobre el antagonismo de *Paenibacillus polymyxa* hacia *Fusarium spp.* encontró que al aumentar el pH aumenta la capacidad antagónica, por otra parte, Chowdhury, N., et al (2022) en su estudio de la actividad biocontroladora de *Bacillus amyloliquefaciens* MBNC encontró que podía inhibir los hongos patógenos en condiciones de pH tanto ácidas como neutras, en donde la mayor inhibición del crecimiento fue en *Fusarium verticillioides*, con un 94% y 82% de inhibición a pH 7,0 y pH 4,5, respectivamente, sin embargo, contra *Fusarium oxysporum* y *Athelia rolfsii* fue mayor a pH 4,5 en comparación con la de pH 7,0, esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, como el caso del aislado SB14, el cual obtuvo la mayor inhibición contra *Fusarium spp.* SH26 a pH 5 y 4, mientras que contra *Fusarium spp.* SH3 a pH 4 fue el antagonismo más bajo.

### 8.2.5 Antagonismo por compuestos volátiles.

Para el aislado SB14 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 contra los compuestos volátiles mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 10). El análisis de comparación LSD

Fisher (Tabla 14) presentó la mayor inhibición por compuestos volátiles contra *Fusarium spp.* SH3 con un 8,0%.

Tabla 14. Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos volátiles de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

Bacteria	Variable	Media
SB14 SH3	PICR	8,0% $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>
SB14 SH26	PICR	4,9% $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>

En cuanto al aislado SB68 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 contra los compuestos volátiles no mostró diferencias significativas con un p-valor mayor a 0,05 (Anexo 11), corroborando esto en el análisis de comparación LSD Fisher (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos volátiles de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

Bacteria	Variable	Media
SB68 SH26	PICR	1,3% $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>
SB68 SH3	PICR	0,9% $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>

El aislado SB14 presentó la mayor inhibición por compuestos volátiles para *Fusarium spp.* SH3 (8,0%) y *Fusarium spp.* SH26 (4,9%), por otra parte, el aislado SB68 mostró una inhibición menor al 1% contra todos los patógenos, esto pudo deberse porque las producciones de compuestos orgánicos volátiles son específicos de cada especie de bacteria (Contarino, R., et al, 2019)

Los resultados obtenidos muestran que la capacidad de inhibición por compuestos volátiles bacterianos contra *Fusarium spp.* es reducida, como exponen los autores Li, X., et al (2020), quienes en su estudio sobre el efecto antifúngico de compuestos orgánicos volátiles aislaron 73 bacterias, de las cuales cinco cepas bacterianas produjeron volátiles capaces de inhibir significativamente a *F. oxysporum f. sp. fragariae* en un rango entre 9,8 a 40,3%. Otro caso de esto es el de Guevara-Avendaño, E., et al (2018), quienes aislaron 45 bacterias de suelo, de las cuales solo 7 cepas tuvieron capacidad inhibitoria

por metabolitos volátiles contra *Fusarium solani*, en un rango entre 14,8 a 28,2%, sin embargo, otros estudios como el de Swadling, I. R., & Jeffries, P. (1998) sobre la capacidad inhibitoria de *Bacillus pumilus* NCIM B 13374 y *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 13373 contra *Botrytis cinérea*, encontró que tenía capacidad de inhibir la germinación de conidias por compuestos no volátiles hasta del 100%, sin embargo, no encontraron producción de compuestos volátiles inhibidores, así mismo, Khan, N., et al (2018) reportó que la inhibición por compuestos volátiles bacterianos era menos efectiva que las bacterias para reducir el crecimiento de hongos, entre los cuales estaba *Fusarium oxysporum*. Por otra parte, autores como Poulaki, E. G., & Tjamos, S. E. (2023) reportaron que la actividad antifúngica de los metabolitos volátiles se puede afectar por el medio de crecimiento y la presencia de ciertos nutrientes, lo anterior podría explicar por qué se observó que la inhibición por compuestos volátiles fue menor que el obtenido en el cultivo dual.

### 8.2.6 Antagonismo por compuestos no volátiles.

Para el aislado SB14 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 contra los compuestos no volátiles mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 12). El análisis comparación LSD Fisher (Tabla 16), mostró que el PICR más alto fue a las 24 horas, posteriormente a las 12 horas y por último a las 0 horas para cada uno de los *Fusarium spp.*, siendo la inhibición más alta contra *Fusarium spp.* SH26 (52,5%).

Tabla 16. Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos no volátiles de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

Bacteria	Variable	Media
SB14 24 h SH26	PICR	52,5% ± 0,01 <sup>F</sup>
SB14 12h SH26	PICR	47,5% ± 0,01 <sup>E</sup>
SB14 24 h SH3	PICR	20,6% ± 0,01 <sup>D</sup>
SB14 12h SH3	PICR	14,5% ± 0,02 <sup>C</sup>
SB14 0h SH26	PICR	3,7% ± 0,01 <sup>B</sup>
SB14 0h SH3	PICR	0,5% ± 0,00 <sup>A</sup>

En cuanto al aislado SB68 el análisis estadístico del porcentaje de inhibición de crecimiento radial de *Fusarium spp.* SH3 y SH26 contra los compuestos no volátiles mostró diferencias significativas con un p-valor menor a 0,05 (Anexo 13). El análisis comparación LSD Fisher (Tabla 17), mostró los PICR más alto contra *Fusarium spp.* SH3 se obtuvo a las 12 horas, mientras que para *Fusarium spp.* SH3 no hubo diferencias significativas en la inhibición con los compuestos no volátiles a las 12 y 24 horas.

Tabla 17. Análisis de comparación LSD Fisher del antagonismo por compuestos no volátiles de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26.

Bacteria	Variable	Media
SB68 12h SH3	PICR	10,4% ± 0,01 <sup>D</sup>
SB68 24 h SH3	PICR	9,0% ± 0,01 <sup>C</sup>
SB68 12h SH26	PICR	3,7% ± 0,01 <sup>B</sup>
SB68 24 h SH26	PICR	3,7% ± 0,01 <sup>B</sup>
SB68 0h SH3	PICR	3,5% ± 0,01 <sup>B</sup>
SB68 0h SH26	PICR	1,5% ± 0,00 <sup>A</sup>

La mayor capacidad inhibitoria por compuestos no volátiles contra *Fusarium spp.* se dio con el aislado SB14, teniendo máximo de 52,5%, en comparación, el mayor biocontrol de SB68 fue de 10,4%, lo anterior podría darse por una mayor emisión de sustancias inhibitorias, como enzimas y antibióticos por parte del aislado SB14, mientras en SB68 la mayor inhibición en el cultivo dual en contraste a la prueba de metabolitos no volátiles se debe posiblemente por una competencia por nutrientes y espacio, y no por la producción de metabolitos difusibles (Guevara-Avenidaño, E., et al 2020). Por otra parte, se encontró que en la mayoría de casos, la mayor inhibición se dio a las 24 horas, estos resultados son similares a los que presentan los autores Jiménez-Delgadillo, R., et al (2018), quienes al evaluar los compuestos no volátiles de *Bacillus subtilis* GBO3 contra *Rhizoctonia solani*, encontraron que a las 12 horas presentó un antagonismo del 25%, mientras que transcurrida las 24 horas fue del 72%, encontrando que la máxima producción de metabolitos antagonicos ocurrió al final de la fase estacionaria.

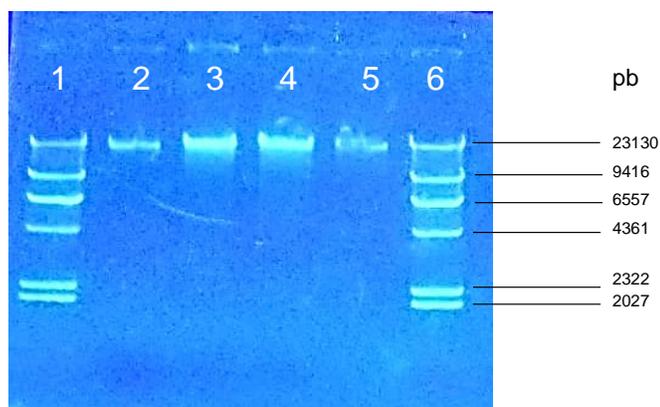
Los valores de antagonismo por compuestos no volátiles fueron menores en comparación con los obtenidos por cultivo dual, esto concuerda con los resultados de Elbouzaoui, A., et al (2022), quien reporta que en cultivo dual rango de inhibición contra *Fusarium spp.* estuvo entre 1 a 75%, mientras que con compuestos difusibles fue del 6 a 38%, asimismo

Guevara-Avenida, E., et al (2020) encontró que compuestos no volátiles de *Bacillus velezensis* puede inhibir un 48,5% el crecimiento de *Fusarium kuroshium* siendo valores cercanos a los obtenidos en este estudio.

### 8.3 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS BACTERIAS CON MEJOR ANTAGONISMO CONTRA *Fusarium spp.* MEDIANTE EL GEN ARNR 16S.

En la Figura 10 se presenta el resultado del ADN total obtenido del aislado SB14 (carril 2 y 3) y SB68 (carril 4 y 5). Se puede apreciar que en todas las muestras se obtuvo una banda definida con fluorescencia intensa ubicadas cerca de la banda de mayor tamaño molecular del patrón de referencia, siendo 23130 pb.

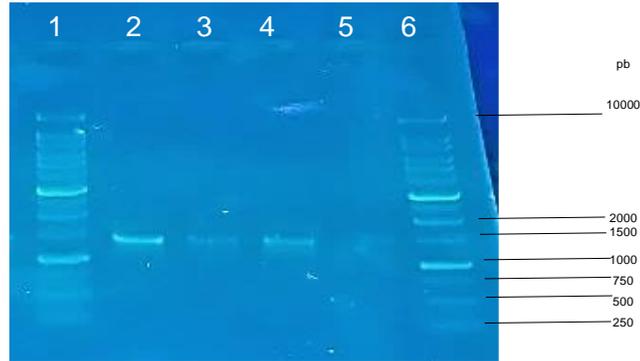
Figura 10. Verificación de la calidad del ADN total de bacterias aisladas



(2, 3)- SB14; (4, 5)- SB68; (1, 6)- Marcador de tamaño molecular lambda Hind III

En cuanto al gen amplificado mediante PCR (Figura 11), se encontró fragmentos de aproximadamente 1500 pb para cada cepa, con lo que se puede concluir que se obtuvieron amplificados esperados del gen 16S.

Figura 11. Verificación de la calidad del ADN amplificado de bacterias aisladas



(2, 3)- SB14; (4, 5)- SB68; (1, 6)- Marcador de tamaño molecular 1Kb ladder

En la comparación con la base de datos GenBank de las dos secuencias, se encontró que pertenecían con un 91,18% de certeza que la identidad de la cepa SB14 corresponde a *Bacillus siamensis*. En cuanto al aislado SB68, se identificó como *Bacillus velezensis*, con un porcentaje de identidad del 90,16%. De acuerdo a los porcentajes de identidad obtenidos se recomienda utilizar otro juego de primers como 1092R y 27F, y/o amplificar otro tipo de genes como *gyrB* y *rpoB* ARNr 23S para corroborar la información.

En cuanto a las cepas de *Bacillus siamensis* se han reportado como bacterias antagonistas contra varios hongos patógenos, entre los cuales se encuentra *Fusarium spp* (You, W., et al 2021). Zhang, K. et al (2022) reportaron que *B. siamensis* inhibió a un 77,2% a *F. graminearum*, mientras que otros autores han reportado una inhibición del 72,5% contra *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (Zhou, L., et al 2022).

Respecto a las cepas de *Bacillus velezensis* se han reportado como antagonistas de *Fusarium spp.*, autores como Hong, S. et al (2022) han reportado que *B. velezensis* CE100 inhibió el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* en 55,2%. Así mismo, Cui, L. et al (2020) encontró que *Bacillus velezensis* 8-4 podía inhibir el crecimiento de *F. avenaceum* en un 51,57%.

Es oportuno mencionar que las cepas de *F. equiseti* y *F. incarnatum* han sido reportadas como patógenos de cultivos de fresa por autores como Zhang, Y. et al (2022) y Li, Mr. Z. et al (2023), sin embargo, no se encontraron reportes que relacionen el efecto inhibitorio de *B. siamensis* y *B. velezensis* contra estas cepas de *Fusarium spp.* encontrados como

patógenos del cultivo de fresa en el municipio de Silvia en el presente estudio, por lo cual se recomienda ampliar las investigaciones al respecto.

## 9. CONCLUSIONES

A partir del muestreo en campo realizado en el presente estudio, se logró identificar hongos del género *Fusarium spp.*, específicamente las cepas *F. equiseti* y *F. incarnatum*, las cuales son reportadas como patógenas para el cultivo de fresa.

Se encontró que el suelo circundante a la raíz presenta una mayor población y diversidad microbiana que la propia raíz, posiblemente debido a la generación de un ambiente propicio en el suelo circundante a la raíz para el desarrollo de hongos y bacterias relacionado con la secreción de exudados ricos en nutrientes por parte de la planta.

A partir del aislamiento de bacterias tanto del suelo rizosférico como de las raíces de fresa en cultivos afectados por infecciones de podredumbre en las raíces, se encontró una diversidad de bacterias con capacidad de ejercer inhibición contra *Fusarium spp.*, resaltando la importancia de las bacterias presentes en estos entornos y su potencial contribución en la lucha contra esta enfermedad que afecta a las plantas de fresa.

A partir del muestreo de suelo rizosférico y de raíces de plantas enfermas de fresa se logró aislar 98 bacterias, de las cuales 37 aislados presentaron un PICR superior al 51% contra *F. equiseti*, y 49 aislados contra *F. incarnatum*. Se encontró que el mejor PICR fue dado por los aislados SB14 (*B. siamensis*) y SB68 (*B. velezensis*).

Se encontró que la cepa *B. siamensis* no se vio afectada por factores como la temperatura y el pH, contrastando la cepa *B. velezensis*, esto sugiere que *B. siamensis* podría ser una valiosa herramienta en los esfuerzos por combatir la propagación de *Fusarium spp.*, ya que su resistencia a factores ambientales lo convierte en un candidato prometedor en la lucha contra esta enfermedad. Por otra parte, ninguna de las cepas generó una inhibición significativa mediante metabolitos volátiles, este hallazgo sugiere que, a pesar de que *B. siamensis* y *B. velezensis* obtuvieron mejores resultados en el cultivo dual, la capacidad antagónica puede estar relacionada con mecanismos distintos a la producción de metabolitos volátiles.

## 10. RECOMENDACIONES

Hacer pruebas en el microscopio electrónico de barrido que permitan evaluar de manera clara la interacción entre el antagonista y el patógeno.

Realizar pruebas de cromatografía para identificar los compuestos disueltos en los cultivos líquidos de la prueba de antagonismo por metabolitos no volátiles para la cepa *B. siamensis*.

Hacer pruebas de detección de actividades de enzimas hidrolíticas extracelulares (celulasa, quitinasa, glucanasa, proteasa) y sideróforos en las bacterias con potencial biocontrolador.

Evaluar la capacidad antagónica de las bacterias seleccionadas contra *Fusarium spp.* en ensayos en invernadero con plantas de fresa.

Utilizar otros juegos de primer y/o amplificar otros genes de bacterias y hongos para verificar la identidad de los microorganismos.

## 11. ANEXOS

ANEXO 1. Características morfológicas macro y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de suelo de Silvia, Cauca.

Aislado	Finca	Descripción microscópica		Descripción macroscópica					
		Morfología	Gram	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Propiedad óptica	Color
SB1	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
SB3	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Crema
SB4	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Gris
SB5	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Crema
SB6	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB7	1	Bacilos	Positivos	Circular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Crema
SB8	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Montañosa	Rugosa	Opaca	Gris
SB9	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
SB11	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB12	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
SB13	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB14	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Áspera	Translúcida	Incolora
SB15	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Crema
SB17	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB18	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
SB19	1	Cocos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
SB20	1	Bacilos	Positivos	Circular	Ondulado	Plana	Rugosa	Brillante	Blanco

SB21	1	Bacilos	Positivos	Circular	Irregular	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Blanco
SB24	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB25	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Crema
SB26	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB28	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB29	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Gris
SB30	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB31	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Crema
SB32	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB33	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Rugosa	Brillante	Blanco
SB34	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
SB35	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Blanco
SB36	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB38	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Incolora
SB39	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Brillante	Gris
SB40	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
SB41	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB42	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante	Crema
SB43	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante	Crema
SB45	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
SB47	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante	Blanco
SB48	1	Bacilos	Positivos	Circular	Ondulado	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Blanco
SB49	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB50	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
SB51	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB52	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Rugosa	Opaca	Crema
SB53	1	Cocos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB54	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema

SB55	1	Bacilos	Positivos	Circular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB56	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Áspera	Translucida	Incolora
SB57	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Incolora
SB59	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Crema
SB60	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante	Blanco
SB61	2	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB64	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Umbonada	Rugosa	Opaca	Gris
SB67	2	Cocos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Incolora
SB68	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Umbilicada	Lisa	Opaca	Blanco
SB69	2	Cocos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB70	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
SB75	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB76	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB77	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Incolora
SB78	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB83	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante	Blanco
SB84	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Incolora
SB85	2	Cocos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB86	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
SB87	2	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
SB89	2	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
SB93	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
SB95	2	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Opaca	Incolora
SB96	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco

---

ANEXO 2. Características morfológicas macro y microscópicas de las cepas bacterianas aisladas a partir de muestras de raíz de Silvia, Cauca.

Aislado	Finca	Descripción microscópica		Descripción macroscópica					
		Morfología	Gram	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Propiedad óptica	Color
RB1	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
RB2	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
RB3	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Opaca	Crema
RB4	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
RB5	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Blanco
RB6	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Opaca	Crema
RB7	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Crema
RB8	1	Bacilos	Positivos	Circular	Irregular	Plana	Áspera	Opaca	Crema
RB9	1	Bacilos	Positivos	Circular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
RB10	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Crema
RB11	1	Bacilos	Positivos	Circular	Irregular	Plana	Rugosa	Brillante	Crema
RB12	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Crema
RB13	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Crema
RB14	1	Bacilos	Negativos	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Opaca	Crema
RB15	1	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Crema
RB16	1	Bacilos	Negativos	Circular	Irregular	Plana	Rugosa	Opaca	Crema
RB17	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Áspera	Brillante	Blanco
RB18	1	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Áspera	Opaca	Crema
RB19	1	Bacilos	Positivos	Circular	Irregular	Plana	Rugosa	Opaca	Crema

RB20	1	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Rugosa	Opaca	Crema
RB21	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
RB22	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
RB23	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Blanco
RB24	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Umbilicada	Rugosa	Opaca	Blanco
RB27	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Crema
RB28	2	Bacilos	Negativos	Circular	Entero	Plana	Lisa	Brillante	Blanco
RB30	2	Bacilos	Positivos	Irregular	Ondulado	Plana	Áspera	Opaca	Blanco
RB31	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Umbilicada	Áspera	Opaca	Blanco
RB32	2	Bacilos	Positivos	Circular	Entero	Plana	Áspera	Brillante	Blanco

---

ANEXO 3. Análisis estadístico de *Fusarium spp.* SH3 y *Fusarium spp.* SH26

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
SH3	294	0,97	0,96	8,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9,23	97	0,10	76,08	<0,0001
Bacteria	9,23	97	0,10	76,08	<0,0001
Error	0,25	196	1,3E-03		
Total	9,47	293			

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
SH26	294	0,94	0,91	10,55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,97	97	0,07	30,61	<0,0001
Bacteria	6,97	97	0,07	30,61	<0,0001
Error	0,46	196	2,3E-03		
Total	7,43	293			

ANEXO 4. Análisis de comparación LSD Fisher *Fusarium spp.* SH3

Bactena	Medias	n	E.E	
SB12	0,000	3	0,020	A
SB34	0,048	3	0,020	A B
SB6	0,066	3	0,020	B C
SB20	0,072	3	0,020	B C
RB10	0,095	3	0,020	B C D
SB15	0,104	3	0,020	B C D E
RB21	0,118	3	0,020	C D E F
SB54	0,136	3	0,020	D E F G
SB3	0,152	3	0,020	E F G H
SB25	0,152	3	0,020	E F G H
RB20	0,157	3	0,020	E F G H I
SB28	0,158	3	0,020	E F G H I
RB30	0,161	3	0,020	F G H I J
SB9	0,168	3	0,020	F G H I J
SB18	0,168	3	0,020	F G H I J
SB52	0,168	3	0,020	F G H I J
SB42	0,184	3	0,020	G H I J K
SB36	0,200	3	0,020	H I J K L
SB50	0,202	3	0,020	H I J K L
SB31	0,211	3	0,020	I J K L M
RB11	0,221	3	0,020	J K L M N
RB17	0,250	3	0,020	K L M N O
SB11	0,263	3	0,020	L M N O P
SB95	0,269	3	0,020	M N O P Q
RB12	0,279	3	0,020	N O P Q R
RB28	0,283	3	0,020	N O P Q R
SB5	0,285	3	0,020	N O P Q R
RB22	0,290	3	0,020	N O P Q R
RB15	0,294	3	0,020	N O P Q R
SB4	0,307	3	0,020	O P Q R S
SB76	0,333	3	0,020	O P Q R S
RB13	0,338	3	0,020	P Q R S T
SB19	0,338	3	0,020	P Q R S T
RB4	0,351	3	0,020	Q R S T U
RB19	0,353	3	0,020	Q R S T U
SB61	0,355	3	0,020	Q R S T U
RB27	0,355	3	0,020	Q R S T U
SB32	0,382	3	0,020	R S T U V
SB41	0,382	3	0,020	R S T U V
SB86	0,383	3	0,020	R S T U V
RB32	0,419	3	0,020	S T U V W
SB96	0,419	3	0,020	S T U V W
SB13	0,424	3	0,020	S T U V W
SB39	0,424	3	0,020	S T U V W
SB1	0,435	3	0,020	T U V W X
SB47	0,467	3	0,020	T U V W X
SB7	0,467	3	0,020	T U V W X
SB8	0,467	3	0,020	T U V W X
SB33	0,472	3	0,020	T U V W X
SB30	0,472	3	0,020	T U V W X
SB43	0,482	3	0,020	U V W X Y
RB31	0,484	3	0,020	U V W X Y Z
SB26	0,485	3	0,020	U V W X Y Z
SB45	0,488	3	0,020	U V W X Y Z
SB29	0,488	3	0,020	U V W X Y Z
SB60	0,490	3	0,020	U V W X Y Z
SB53	0,504	3	0,020	W X Y Z a
SB49	0,504	3	0,020	W X Y Z a
RB23	0,505	3	0,020	W X Y Z a b
RB16	0,515	3	0,020	W X Y Z a b c
RB14	0,515	3	0,020	W X Y Z a b c
SB21	0,520	3	0,020	W X Y Z a b c d
SB48	0,526	3	0,020	X Y Z a b c d e
SB75	0,527	3	0,020	X Y Z a b c d e
RB3	0,527	3	0,020	X Y Z a b c d e
SB24	0,529	3	0,020	Y Z a b c d e f
SB35	0,535	3	0,020	Y Z a b c d e f
SB38	0,536	3	0,020	Y Z a b c d e f
SB51	0,536	3	0,020	Y Z a b c d e f
RB9	0,541	3	0,020	Z a b c d e f g
SB67	0,541	3	0,020	Z a b c d e f g
RB2	0,554	3	0,020	a b c d e f g h
SB87	0,554	3	0,020	a b c d e f g h
SB78	0,556	3	0,020	a b c d e f g h
RB24	0,556	3	0,020	a b c d e f g h
SB55	0,561	3	0,020	b c d e f g h i
SB84	0,568	3	0,020	c d e f g h i j
RB18	0,569	3	0,020	c d e f g h i j
SB70	0,577	3	0,020	d e f g h i j k
SB83	0,577	3	0,020	d e f g h i j k
SB57	0,579	3	0,020	e f g h i j k l
SB56	0,588	3	0,020	f g h i j k l m
SB40	0,588	3	0,020	f g h i j k l m
SB59	0,588	3	0,020	f g h i j k l m
SB64	0,595	3	0,020	f g h i j k l m
SB14	0,603	3	0,020	g h i j k l m n
RB1	0,608	3	0,020	h i j k l m n o
SB17	0,614	3	0,020	i j k l m n o p
RB5	0,622	3	0,020	j k l m n o p
RB6	0,622	3	0,020	j k l m n o p
SB77	0,631	3	0,020	k l m n o p
SB69	0,631	3	0,020	k l m n o p
RB7	0,631	3	0,020	k l m n o p
SB85	0,640	3	0,020	l m n o p q
RB8	0,658	3	0,020	m n o p q r
SB89	0,658	3	0,020	m n o p q r
SB93	0,667	3	0,020	n o p q r s
SB68	0,689	3	0,020	o p q r s t

ANEXO 5. Análisis de comparación LSD Fisher *Fusarium spp.* SH26

Bacteria	Medias	n	E.E.	
SB86	0,000	3	0,030	A
SB12	0,000	3	0,030	A
SB33	0,094	3	0,030	B
SB28	0,158	3	0,030	B C
SB13	0,172	3	0,030	B C D
SB34	0,175	3	0,030	C D
SB31	0,184	3	0,030	C D
SB9	0,188	3	0,030	C D E
SB42	0,198	3	0,030	C D E F
SB3	0,208	3	0,030	C D E F G
SB6	0,210	3	0,030	C D E F G
SB25	0,240	3	0,030	D E F G H
SB50	0,263	3	0,030	E F G H I
SB20	0,266	3	0,030	F G H I
SB36	0,281	3	0,030	G H I J
SB11	0,289	3	0,030	H I J
RB13	0,292	3	0,030	H I J
RB27	0,312	3	0,030	H I J K
SB52	0,313	3	0,030	H I J K
SB18	0,313	3	0,030	H I J K
SB76	0,322	3	0,030	I J K L
RB17	0,324	3	0,030	I J K L
RB19	0,347	3	0,030	J K L M
SB75	0,356	3	0,030	J K L M
RB20	0,375	3	0,030	K L M N
SB61	0,378	3	0,030	K L M N
RB30	0,378	3	0,030	K L M N
SB84	0,378	3	0,030	K L M N
SB67	0,400	3	0,030	L M N O
RB2	0,413	3	0,030	M N O
RB21	0,417	3	0,030	M N O
SB78	0,422	3	0,030	M N O P
RB3	0,422	3	0,030	M N O P
SB64	0,422	3	0,030	M N O P
RB31	0,436	3	0,030	N O P Q
RB4	0,450	3	0,030	N O P Q R
RB5	0,463	3	0,030	O P Q R S
SB95	0,467	3	0,030	O P Q R S T
SB30	0,469	3	0,030	O P Q R S T
RB15	0,472	3	0,030	O P Q R S T U
RB23	0,477	3	0,030	O P Q R S T U W
SB83	0,478	3	0,030	O P Q R S T U W X
SB87	0,478	3	0,030	O P Q R S T U W X
SB70	0,478	3	0,030	O P Q R S T U W X
SB77	0,478	3	0,030	O P Q R S T U W X
SB85	0,500	3	0,030	P Q R S T U W X Y
SB57	0,500	3	0,030	P Q R S T U W X Y
SB45	0,510	3	0,030	Q R S T U W X Y Z
SB96	0,511	3	0,030	Q R S T U W X Y Z a
SB39	0,518	3	0,030	R S T U W X Y Z a
SB8	0,521	3	0,030	R S T U W X Y Z a b
SB53	0,521	3	0,030	R S T U W X Y Z a b
SB68	0,522	3	0,030	R S T U W X Y Z a b
RB22	0,522	3	0,030	R S T U W X Y Z a b
SB32	0,528	3	0,030	S T U W X Y Z a b c
SB38	0,531	3	0,030	S T U W X Y Z a b c
SB49	0,531	3	0,030	S T U W X Y Z a b c
SB21	0,531	3	0,030	S T U W X Y Z a b c
RB24	0,532	3	0,030	S T U W X Y Z a b c
SB1	0,544	3	0,030	T U W X Y Z a b c d
SB69	0,544	3	0,030	T U W X Y Z a b c d
SB29	0,547	3	0,030	U W X Y Z a b c d e
SB51	0,552	3	0,030	W X Y Z a b c d e
SB89	0,556	3	0,030	X Y Z a b c d e
RB7	0,556	3	0,030	X Y Z a b c d e
RB16	0,556	3	0,030	X Y Z a b c d e
RB14	0,556	3	0,030	X Y Z a b c d e
SB60	0,556	3	0,030	X Y Z a b c d e
RB32	0,560	3	0,030	Y Z a b c d e f
SB48	0,561	3	0,030	Y Z a b c d e f
SB93	0,567	3	0,030	Y Z a b c d e f g
SB59	0,569	3	0,030	Y Z a b c d e f g
SB41	0,574	3	0,030	Y Z a b c d e f g
SB19	0,574	3	0,030	Y Z a b c d e f g
SB17	0,579	3	0,030	Z a b c d e f g
SB55	0,579	3	0,030	Z a b c d e f g
RB8	0,583	3	0,030	Z a b c d e f g h
SB26	0,583	3	0,030	Z a b c d e f g h
RB1	0,587	3	0,030	Z a b c d e f g h
SB35	0,588	3	0,030	Z a b c d e f g h
SB5	0,588	3	0,030	Z a b c d e f g h
SB7	0,588	3	0,030	Z a b c d e f g h
RB28	0,589	3	0,030	a b c d e f g h i
SB43	0,597	3	0,030	b c d e f g h i
SB4	0,597	3	0,030	b c d e f g h i
RB18	0,597	3	0,030	b c d e f g h i
SB54	0,605	3	0,030	c d e f g h i j
SB15	0,605	3	0,030	c d e f g h i j
SB24	0,611	3	0,030	d e f g h i j k
SB47	0,614	3	0,030	d e f g h i j k
RB11	0,620	3	0,030	d e f g h i j k
RB10	0,630	3	0,030	e f g h i j k
SB56	0,639	3	0,030	f g h i j k
RB6	0,642	3	0,030	f g h i j k
RB12	0,657	3	0,030	g h i j k
SB40	0,667	3	0,030	i j k
RB9	0,681	3	0,030	j k
SB14	0,685	3	0,030	k

ANEXO 6. Análisis estadístico de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes temperaturas

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	12	0,97	0,96	7,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,32	3	0,11	101,52	<0,0001
BACTERIA	0,32	3	0,11	101,52	<0,0001
Error	0,01	8	1,1E-03		
Total	0,33	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,06142

Error: 0,0011 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.
SB14 10°C SH26	0,25	3	0,02 A
SB14 10°C SH3	0,26	3	0,02 A
SB14 20°C SH26	0,56	3	0,02 B
SB14 20°C SH3	0,60	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 7. Análisis estadístico de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes temperaturas

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	12	0,92	0,89	9,97

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,05	3	0,02	30,57	0,0001
BACTERIA	0,05	3	0,02	30,57	0,0001
Error	4,4E-03	8	5,6E-04		
Total	0,06	11			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,04441

Error: 0,0006 gl: 8

BACTERIA	Medias	n	E.E.
SB68 10°C SH26	0,17	3	0,01 A
SB68 20°C SH26	0,21	3	0,01 A
SB68 10°C SH3	0,21	3	0,01 A
SB68 20°C SH3	0,35	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 8. Análisis estadístico de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes pH

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	18	0,66	0,52	7,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	5	0,01	4,64	0,0138
BACTERIA	0,04	5	0,01	4,64	0,0138
Error	0,02	12	1,8E-03		
Total	0,06	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07612

Error: 0,0018 gl: 12

BACTERIA	Medias	n	E.E.
SB14 pH= 4 SH3	0,45	3	0,02 A
SB14 pH= 6 SH26	0,53	3	0,02 B
SB14 pH= 6 SH3	0,57	3	0,02 B
SB14 pH= 4 SH26	0,57	3	0,02 B
SB14 pH= 5 SH3	0,58	3	0,02 B
SB14 pH= 5 SH26	0,59	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 9. Análisis estadístico de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26 a diferentes pH

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	18	0,66	0,52	7,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	5	0,01	4,64	0,0138
BACTERIA	0,04	5	0,01	4,64	0,0138
Error	0,02	12	1,8E-03		
Total	0,06	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,07612

Error: 0,0018 gl: 12

BACTERIA	Medias	n	E.E.
SB14 pH= 4 SH3	0,45	3	0,02 A
SB14 pH= 6 SH26	0,53	3	0,02 B
SB14 pH= 6 SH3	0,57	3	0,02 B
SB14 pH= 4 SH26	0,57	3	0,02 B
SB14 pH= 5 SH3	0,58	3	0,02 B
SB14 pH= 5 SH26	0,59	3	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 10. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos volátiles de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	6	0,68	0,60	20,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,4E-03	1	1,4E-03	8,40	0,0442
BACTERIA	1,4E-03	1	1,4E-03	8,40	0,0442
Error	6,8E-04	4	1,7E-04		
Total	2,1E-03	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,02963

Error: 0,0002 gl: 4

BACTERIA	Medias	n	E.E.
SB14 SH26	0,05	3	0,01 A
SB14 SH3	0,08	3	0,01 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 11. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos volátiles de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	6	0,07	0,00	69,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,8E-05	1	1,8E-05	0,31	0,6077
BACTERIA	1,8E-05	1	1,8E-05	0,31	0,6077
Error	2,4E-04	4	5,9E-05		
Total	2,6E-04	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01747

Error: 0,0001 gl: 4

BACTERIA	Medias	n	E.E.
SB68 SH3	0,01	3	4,4E-03 A
SB68 SH26	0,01	3	4,4E-03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 12. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos no volátiles de SB14 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	18	1,00	1,00	4,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,73	5	0,15	1518,26	<0,0001
Bacteria	0,73	5	0,15	1518,26	<0,0001
Error	1,1E-03	12	9,6E-05		
Total	0,73	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01741

Error: 0,0001 gl: 12

Bacteria	Medias	n	E.E.
SB14 0h SH3	0,01	3	0,01 A
SB14 0h SH26	0,04	3	0,01 B
SB14 12h SH3	0,15	3	0,01 C
SB14 24 h SH3	0,21	3	0,01 D
SB14 12h SH26	0,48	3	0,01 E
SB14 24 h SH26	0,53	3	0,01 F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

ANEXO 13. Análisis estadístico del antagonismo por compuestos no volátiles de SB68 contra *Fusarium spp.* SH3 y SH26

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PICR	18	0,97	0,96	12,30

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	5	3,8E-03	88,24	<0,0001
Bacteria	0,02	5	3,8E-03	88,24	<0,0001
Error	5,1E-04	12	4,3E-05		
Total	0,02	17			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01163

Error: 0,0000 gl: 12

Bacteria	Medias	n	E.E.
SB68 0h SH26	0,01	3	3,8E-03 A
SB68 0h SH3	0,03	3	3,8E-03 B
SB68 24 h SH26	0,04	3	3,8E-03 B
SB68 12h SH26	0,04	3	3,8E-03 B
SB68 24 h SH3	0,09	3	3,8E-03 C
SB68 12h SH3	0,10	3	3,8E-03 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Azeem, A. M., Abdel-Azeem, M. A., Darwish, A. G., Nafady, N. A., & Ibrahim, N. A. (2019). *Fusarium: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications*. 201–261. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_6)
- Abd-El-Kareem, F., Elshahawy, I. E., & Abd-Elgawad, M. M. M. (2021). Application of *Bacillus pumilus* isolates for management of black rot disease in strawberry. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1–5. <https://www-scopus-com.acceso.unicauca.edu.co/record/display.uri?eid=2-s2.0-85100421896&origin=resultslist&zone=contextBox>
- Agronet (2023). Estadísticas home. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=4>
- Alcaldía Municipal de Silvia (2018). Geografía. <http://www.silvia-cauca.gov.co/municipio/geografia>
- Bader, A. N., Salerno, G. L., Covacevich, F., & Consolo, V. F. (2020). Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 867–873. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2019.04.002>
- Bárceñas-Santana, D., Guillén-Sánchez, D., Yazmín-Basaldua, C., Ramos-García, M. de L., Valle-de la Paz, M., (2019). Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(3), 454–463. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1904-5>
- Benaissa, A. (2023). Plant beneficial bacteria from rhizosphere as biocontrol agents of phytopathogens. *Vegetos*, 1–4. <https://link-springer-com.acceso.unicauca.edu.co/article/10.1007/s42535-022-00555-4>
- Bisutti, I. L., Pelz, J., Büttner, C., & Stephan, D. (2017). Field assessment on the influence of RhizoVital® 42 fl. and Trichostar® on strawberries in the presence of soil-borne diseases. *Crop Protection*, 96, 195–203. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2017.02.004>
- Bubici, G., Kaushal, M., Prigigallo, M. I., Cabanás, C. G. L., & Mercado-Blanco, J. (2019). Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR), 445720. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00616/BIBTEX>
- Burbano, E., Caetano, B., Otero, I. & Lorena, S. (2017). Manual de Biología Molecular- Procedimientos Básicos. Editorial Universitaria-Universidad de Nariño.
- Campbell, C., Johnson, E., & Warnock, D. G. (2013). Identification of Pathogenic Fungi. Wiley Blackwell.

- Cano, M. (2013). *Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (Fragaria spp.)*. Retrieved September 26, 2023, from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v7n2/v7n2a11.pdf>
- Castellanos, L., Baldovino, A., Céspedes, N., Rivera, X., Castellanos, L., Baldovino, A., Céspedes, N., & Rivera, X. (2020). Biopreparados para el control de enfermedades foliares de fresa, Pamplona, Colombia, aun una solución parcial. *Journal of Negative and No Positive Results*, 5(9), 933–951. <https://doi.org/10.19230/JONNPR.3419>
- Chávez-Díaz, I. F., Zelaya Molina, L. X., Cruz Cárdenas, C. I., Rojas Anaya, E., Ruíz Ramírez, S., & Santos Villalobos, S. de los. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro-biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(6), 1423–1436. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V11I6.2492>
- Chen, P. H., Chen, R. Y., & Chou, J. Y. (2018). Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of Botrytis cinerea on Strawberry Fruits. *Mycobiology*, 46(1), 33–46. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1454013>
- Chen, Y., Xu, Y., Zhou, T., Akkaya, M. S., Wang, L., Li, S., & Li, X. (2020). Biocontrol of Fusarium wilt disease in strawberries using bioorganic fertilizer fortified with Bacillus licheniformis X-1 and Bacillus methylothrophicus Z-1. *Biotech*, 10(2), 80. <https://doi.org/10.1007/S13205-020-2060-6>
- Chowdhury, N., Hazarika, D. J., Goswami, G., Sarmah, U., Borah, S., Boro, R. C., & Barooah, M. (2022). Acid tolerant bacterium Bacillus amyloliquefaciens MBNC retains biocontrol efficiency against fungal phytopathogens in low pH. *Archives of Microbiology*, 204(2), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02741-5/TABLES/4>
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, 82, 70–74. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.01.008>
- Corrales Ramírez, L. C., Arévalo Galvez, Z. Y., & Moreno Burbano, V. E. (2014). *Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal*. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702014000100006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702014000100006&script=sci_arttext)
- Cruz Coronel, A. (2022). Control biológico de Fusarium solani resistente a fungicidas con cepas de Trichoderma spp.: Una alternativa agroecológica para el cultivo de fresa en Puebla, México (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla). <https://hdl.handle.net/20.500.12371/16423>
- Cui, L., Yang, C., Wei, L., Li, T., & Chen, X. (2020). Isolation and identification of an endophytic bacteria Bacillus velezensis 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab. *Biological Control*, 141, 104156. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2019.104156>

- Elbouzaoui, A., Sijilmassi, B., Maafa, I., Allal, D., & Ahmed, S. (2022). Biocontrol activity of *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas* against *Fusarium* wilt of chickpea in Morocco. *https://Doi.Org/10.1080/09064710.2022.2100819*, 72(1), 847–859. <https://doi.org/10.1080/09064710.2022.2100819>
- Elbouzaoui, A., Sijilmassi, B., Maafa, I., Allal, D., & Ahmed, S. (2022). Biocontrol activity of *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas* against *Fusarium* wilt of chickpea in Morocco. *https://Doi.Org/10.1080/09064710.2022.2100819*, 72(1), 847–859. <https://doi.org/10.1080/09064710.2022.2100819>
- Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2016). Rhizosphere and endorhiza of oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant harbor bacteria with multifaceted beneficial effects. *Biological Control*, 94, 11–24. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2015.12.003>
- Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2017). Evaluation of Gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 147(1), 7–14. <https://doi.org/10.1007/S10658-016-0981-Z/TABLES/2>
- Fang, X., You, M. P., & Barbetti, M. J. (2012). Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. *European Journal of Plant Pathology*, 134(3), 619–629. <https://doi.org/10.1007/S10658-012-0042-1/TABLES/4>
- FAOSTAT. (s.f.). *Cultivos y productos de ganadería*. Retrieved September 12, 2023, from <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Flórez Faura, R., & Mora Cabeza, R. A. (2010). *Fresa (fragaria x ananassa Duch.): producción y manejo poscosecha*. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13332>
- Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., & Gargouri-Bouzid, R. (2022). Los compuestos orgánicos volátiles de *Bacillus* *mojavensis* I4 promueven el crecimiento de las plantas e inhiben los fitopatógenos. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101887. <https://www-sciencedirect-com.acceso.unicauca.edu.co/science/article/pii/S0885576522001023?via%3Dihub>
- Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., & Gargouri-Bouzid, R. (2022). Los compuestos orgánicos volátiles de *Bacillus* *mojavensis* I4 promueven el crecimiento de las plantas e inhiben los fitopatógenos. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 121, 101887. <https://www-sciencedirect-com.acceso.unicauca.edu.co/science/article/pii/S0885576522001023?via%3Dihub>
- gob. (2020). *Fusarium* spp. (Hypocreales: Nectriaceae) Podredumbre de raíces. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium\\_spp\\_\\_ma\\_z\\_\\_2020.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp__ma_z__2020.pdf)
- Gordon, T. R., Daugovish, O., Koike, S. T., Islas, C. M., Kirkpatrick, S. C., Yoshisato, J. A., & Shaw, D. v. (2016). Options for Management of *Fusarium* Wilt of Strawberry in

- California. <https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1219294>, 16, 160–168.  
<https://doi.org/10.1080/15538362.2016.1219294>
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Sisquella, M., Torres, R., & Usall, J. (2017). Biological Characterization of the Biocontrol Agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: The Effect of Temperature, pH and Water Activity on Growth, Susceptibility to Antibiotics and Detection of Enterotoxigenic Genes. *Current Microbiology*, 74(9), 1089–1099. <https://doi.org/10.1007/S00284-017-1289-8/FIGURES/4>
- Granados-Montero, M., Zúñiga-Castañeda, M., Chaverri-Echandi, P., Escudero-Leyva, E., Mardones-Hidalgo, (2022). Patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa (*Fragaria ananassa*) y descripción ultraestructural del patosistema. *Agronomía Costarricense*, 46(2), 9–28. <https://doi.org/10.15517/RAC.V46I2.52043>
- Guevara-Avendaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A.-L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., Aguirre Von Wobeser, E., Sánchez-Rangel, D., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen, A., & Reverchon, F. (2018). *Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against Fusarium solani, Fusarium sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and Colletotrichum gloeosporioides*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.009>
- Guevara-Avendaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., & Reverchon, F. (2020). Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 861–873. <https://doi.org/10.1007/S42770-020-00249-6/TABLES/3>
- Higuera, F. (1983). *Fresa*. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19076>.
- Hong, S., Kim, T. Y., Won, S.-J., Moon, J.-H., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., & Ahn, Y. S. (2022). Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using *Bacillus velezensis* CE 100. *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 365, 10(2), 365. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020365>
- Huang, Y., Xiao, X., Huang, H., Jing, J., Zhao, H., Wang, L., & Long, X. E. (2018). Contrasting beneficial and pathogenic microbial communities across consecutive cropping fields of greenhouse strawberry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(13), 5717–5729. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9013-6/FIGURES/4>
- ICA. (2022). *Registros nacionales de plaguicidas*. [https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/agricultura-ecologica-1/documentos/publicacion-bd\\_rn-rf\\_-31-mar-2022-1.aspx](https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/agricultura-ecologica-1/documentos/publicacion-bd_rn-rf_-31-mar-2022-1.aspx)
- Jiang, J., Yu, M., Hou, R., Li, L., Ren, X., Jiao, C., Yang, L., & Xu, H. (2019). Changes in the soil microbial community are associated with the occurrence of *Panax quinquefolius* L. root rot diseases. *Plant and Soil*, 438(1–2), 143–156. <https://doi.org/10.1007/S11104-018-03928-4/FIGURES/10>

- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., García-Hernández, J. L., (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 256–275. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1711-3>
- Katherine, D., & Bernal, A. (2017). *ANALYSIS OF BEHAVIOR OF PERSISTENCE IN SOILS OF AGROCHEMICALS USED IN STRAWBERRY CULTIVATION IN FACATATIVA CUNDINAMARCA*. <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/16946/AguileraBernalDianaKatherine2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of bacillus species against fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 401553. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02363/BIBTEX>
- Koike, S. T., & Gordon, T. R. (2015). Management of Fusarium wilt of strawberry. *Crop Protection*, 73, 67–72. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2015.02.003>
- Li, Mr. Z., Yu, M. X., Zhang, M. W., Han, Mr. R., Zhang, M. J., Ma, M. Y., Guo, Dr. L., Wang, Prof. X., Zhao, Dr. J., & Xiang, Prof. W. (2023). Identification, Characterization and Pathogenicity of Fungi Associated with Strawberry Fruit Rot in Shandong Province, China. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0696-RE>
- Li, X., Wang, X., Shi, X., Wang, B., Li, M., Wang, Q., & Zhang, S. (2020). Antifungal Effect of Volatile Organic Compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 1674, 8(12), 1674. <https://doi.org/10.3390/PR8121674>
- Li, Y., Xia, X., Zhao, Q., & Dong, P. (2022). The biocontrol of potato dry rot by microorganisms and bioactive substances: A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 122, 101919. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2022.101919>
- Liu, J., Qin, D., Huang, W., Wang, X., Li, Y., & Zhang, R. (2023). Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* Baf1 against *Fusarium incarnatum* causing fruit rot in postharvest muskmelon (cv. Yugu) fruit. *LWT*, 181, 114714. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114714>
- Lopez, S., & Victoria, D. (2016). Tolerancia de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) premicorrizadas con *Rhizophagus intraradices* e inoculadas con PGPR's a *Phytophthora capsici*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952016000801107](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000801107)
- Lu, C., Zhang, H., Wang, Y., & Zheng, X. (2015). Rapid diagnosis of Fusarium root rot in soybean caused by *Fusarium equiseti* or *Fusarium graminearum* using loop-mediated

- isothermal amplification (LAMP) assays. *Australasian Plant Pathology*, 44(4), 437–443. <https://doi.org/10.1007/S13313-015-0361-8/FIGURES/1>
- Minagricultura. (2021). *Cadena de la fresa*. <https://sioc.minagricultura.gov.co/Fresa/Documentos/2021-03-31%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., Contreras-Paredes, C. A., (2020). Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista in vitro de *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(3), 434–449. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-7>
- Nagraj, D., Achar, P. N., & Sreenivasa, M. Y. (2021). Current Perspectives of Biocontrol Agents for Management of *Fusarium verticillioides* and Its Fumonisin in Cereals—A Review. *Journal of Fungi 2021*, Vol. 7, Page 776, 7(9), 776. <https://doi.org/10.3390/JOF7090776>
- Ngo, V. A., Wang, S. L., Nguyen, V. B., Doan, C. T., Tran, T. N., Tran, D. M., Tran, T. D., & Nguyen, A. D. (2020). Phytophthora Antagonism of Endophytic Bacteria Isolated from Roots of Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Agronomy 2020*, Vol. 10, Page 286, 10(2), 286. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10020286>
- Olowe, O. M., Nicola, L., Asemoloye, M. D., Akanmu, A. O., Sobowale, A. A., & Babalola, O. O. (2022). Characterization and antagonistic potentials of selected rhizosphere *Trichoderma* species against some *Fusarium* species. *Frontiers in Microbiology*, 13, 3757. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.985874/full>
- Paco Pérez, V., Gonzales Torrico, M., Barrientos, E., Carevic, F. S., (2022). Influencia bacteriana y fúngica en la mineralización de estiércol bovino: evidencia sobre la fertilidad del suelo en el cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 24(1), 9–16. <https://doi.org/10.18271/RIA.2022.358>
- Paola, S. (2023). *CONTEXTO DE CADENA FRESA*. [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/37968/Ver\\_Documento\\_37968.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/37968/Ver_Documento_37968.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Pastrana, A., Basallote, M., Aguado, A., Akdi, A., & Capote, N. (2016). *Biological control of strawberry soil-borne pathogens macrofomin phaseolina and fusarium solani, using trichoderma asperellum and Bacilo sp..* <https://oajournals.fupress.net/index.php/pm/article/view/5653/5651>
- Patel, R., Mehta, K., Prajapati, J., Shukla, A., Parmar, P., Goswami, D., & Saraf, M. (2022). An anecdote of mechanics for *Fusarium* biocontrol by plant growth promoting microbes. *Biological Control*, 174, 105012. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.105012>
- Podgórska-Kryszczuk, I., Solarska, E., & Kordowska-Wiater, M. (2022). Biological Control of *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* by Antagonistic

- Yeasts. *Pathogens* 2022, Vol. 11, Page 86, 11(1), 86.  
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11010086>
- Poulaki, E. G., & Tjamos, S. E. (2023). BacillusSpecies: Factories of plant protective volatile organic compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 134(3).  
<https://doi.org/10.1093/jambio/lxad037>
- Ran, J., Wu, Y., Zhang, B., Su, Y., Lu, N., Li, Y., Liang, X., Zhou, H., & Shi, J. (2023). Paenibacillus polymyxa Antagonism towards Fusarium: Identification and Optimisation of Antibiotic Production. *Toxins* 2023, Vol. 15, Page 138, 15(2), 138.  
<https://doi.org/10.3390/TOXINS15020138>
- Riveros, N., & Rosero, R. (2019). AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PROCEDENTES DE MACROORGANISMOS MARINOS COLOMBIANOS, COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE Colletotrichum spp CAUSANTE DE ANTRACNOSIS EN FRESA (Fragaria sp) NATALIA RIVEROS FRAILE RUBI ALEJANDRA ROSERO CALDERON.  
<https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/308/1%20PARA%20SUBIR%20Natalia%20Riveros%20Fraile-Rubi%20Rosero%20Calder%c3%b3n%20%281%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Sabbahi, R., Hock, V., Azzaoui, K., Saoiabi, S., & Hammouti, B. (2022). A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10, 100376.  
<https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2022.100376>
- Shen, T., Wang, C., Yang, H., Deng, Z., Wang, S., Shen, B., & Shen, Q. (2016). Identification, solid-state fermentation and biocontrol effects of Streptomyces hygrosopicus B04 on strawberry root rot. *Applied Soil Ecology*, 103, 36–43.  
<https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2016.02.016>
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., & Berg, G. (2001). Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4742–4751.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4742-4751.2001/ASSET/4F93B42D-3A3F-4872-B688-ACAFAB4EF152/ASSETS/GRAPHIC/AM1010637005.JPEG>
- Sosa López, A. I., Pazos Álvarez-Rivera, V., Borges Marín, G., González García, M., & 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.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1562-30092011000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092011000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Summerell, B. A., Leslie, J. F., Liew, E. C. Y., Laurence, M. H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley, A. R., Howard, C. G., Peterson, S. A., Walsh, J. L., & Burgess, L. W. (2011). Fusarium species associated with plants in Australia. *Fungal Diversity*, 46(1), 1–27. <https://doi.org/10.1007/S13225-010-0075-8/METRICS>
- Sun, Q., Harishchandra, D., Jia, J., Zuo, Q., Zhang, G., Wang, Q., Yan, J., Zhang, W., & Li, X. (2021). Role of *Neopestalotiopsis rosae* in causing root rot of strawberry in Beijing, China. *Crop Protection*, 147, 105710. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2021.105710>
- Swadling, I. R., & Jeffries, P. (1998). Antagonistic Properties of Two Bacterial Biocontrol Agents of Grey Mould Disease. *Biocontrol Science and Technology*, 8(3), 439–448. doi:10.1080/09583159830234
- Técnica, N., Benítez-Díaz, P., Miranda-Contreras, L., Balza-Quintero, A., Sánchez-Gil, B., & Molina-Morales, Y. (2015). Residuos de plaguicidas en fresa (*Fragaria x ananassa*) cosechada en una región agrícola del estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*, 27(3), 181–188. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612015000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612015000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Toh, S. C., Samuel, L., & Awang, A. S. A. H. (2016). Screening for antifungal-producing bacteria from *Piper nigrum* plant against *Phytophthora capsici*. *International Food Research Journal*, 23(6), 2616–2622. [http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20\(06\)%202016/\(43\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(06)%202016/(43).pdf)
- Vehapi, M., İnan, B., Kayacan-Cakmakoglu, S., Sagdic, O., & Özçimen, D. (2023). Optimization of Growth Conditions for the Production of *Bacillus subtilis* Using Central Composite Design and Its Antagonism Against Pathogenic Fungi. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(3), 682–693. <https://doi.org/10.1007/S12602-021-09904-2/FIGURES/5>
- Vergara, M., Vargas, J., Acuña, J., Vergara, M., Vargas, J., & Acuña, J. (2018). Physicochemical characteristics of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits from four production zones in Cundinamarca, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 36(3), 227–236. <https://doi.org/10.15446/AGRON.COLOMB.V36N3.71731>
- Wang, S., Wang, J., Zhou, Y., Huang, Y., & Tang, X. (2022). Comparative Analysis on Rhizosphere Soil and Endophytic Microbial Communities of Two Cultivars of *Cyperus esculentus* L. Var. *Sativus*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 22(2), 2156–2168. <https://doi.org/10.1007/S42729-022-00800-4/FIGURES/5>
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (3rd ed.). CRC Press.
- Wu, Z., Hao, Z., Zeng, Y., Guo, L., Huang, L., & Chen, B. (2015). Molecular characterization of microbial communities in the rhizosphere soils and roots of

- diseased and healthy *Panax notoginseng*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(5), 1059–1074. <https://doi.org/10.1007/S10482-015-0560-X/FIGURES/5>
- Yang, W. T., Li, G. D., Li, J. N., Yang, C. F., Zhang, X. M., & Zhang, A. L. (2023). Comparative Analysis of Rhizosphere and Endophytic Microbial Communities Between Root Rot and Healthy Root of *Psammosilene tunicoides*. *Current Microbiology*, 80(7), 215. <https://doi.org/10.1007/S00284-023-03290-4/FIGURES/5>
- You, W., Ge, C., Jiang, Z., Chen, M., Li, W., & Shao, Y. (2021). Screening of a broad-spectrum antagonist-Bacillus siamensis, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits. *Biological Control*, 157, 104584. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2021.104584>
- Zhang, K., Wang, L., Si, H., Guo, H., Liu, J., Jia, J., Su, Q., Wang, Y., Zang, J., Xing, J., & Dong, J. (2022). Maize stalk rot caused by *Fusarium graminearum* alters soil microbial composition and is directly inhibited by *Bacillus siamensis* isolated from rhizosphere soil. *Frontiers in Microbiology*, 13, 986401. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.986401/BIBTEX>
- Zhang, X., Li, S., Ma, Z., Cai, Q., Zhou, T., & Wu, X. (2022). Complete genome sequence of a novel mitovirus isolated from the fungus *Fusarium equiseti* causing potato dry rot. *Archives of Virology*, 167(12), 2777–2781. <https://doi.org/10.1007/S00705-022-05578-5/FIGURES/2>
- Zhang, Y., Yu, H., Hu, M., Wu, J., & Zhang, C. (2022). Fungal Pathogens Associated with Strawberry Crown Rot Disease in China. *Journal of Fungi*, 8(11), 1161. <https://doi.org/10.3390/JOF8111161/S1>
- Zhou, L., Wang, J., Wu, F., Yin, C., Kim, K. H., & Zhang, Y. (2022). Termite Nest Associated *Bacillus siamensis* YC-9 Mediated Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 893393. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.893393/BIBTEX>