http://doi.org/10.5281/zenodo.15571986

Caracterización de hongos fitopatógenos en plantíos de Agave mezcalero (*A. potatorum*) y su biocontrol con bacterias cianotróficas

Deayean Andrey Vázquez-Hernández[1] iD, José Terrones-Salgado[2,3,4] iD, Ligia Catalina Muñoz-Arenas[1,3,4] iD

[1]Facultad de Ingeniería Ambiental-Universidad UPAEP, Puebla, México. [2]Escuela de Agronomía-Universidad UPAEP, Puebla, México. [3]Centro de Investigación en Horticultura y Plantas Nativas-Universidad UPAEP, Puebla, México. [4]Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla, Puebla, México.

Email de autor para correspondencia: *ligiacatalina.munoz@upaep.mx

Recibido: 17 octubre 2024. **Aceptado:** 17 abril 2025

RESUMEN

Agave potatorum es un importante cultivo para la producción de mezcal en el estado de Puebla cuya siembra en monocultivo se ha extendido a gran escala desde que se consiguió la denominación de origen. En octubre de 2022, en el municipio de Tecali de Herrera, Puebla, en una investigación de campo, se observaron y muestrearon plantas de *Agave potatorum* de 1.5 años con síntomas de infección por hongos: follaje amarillento, marchitez y reducción en el crecimiento. De las plantas infectadas se aislaron e identificaron morfométrica, morfológica, cultural y molecularmente (ITS), 2 cepas de hongos fitopatógenos: *Alternaria alternata y Fusarium sporotrichioides.* Posteriormente, como alternativa de tratamiento se probó el potencial antagonista de 5 cepas de bacterias cianotróficas aisladas de relaves mineros: *Brevundimonas vesicularis*, *Bacillus cereus*, *Cellulosimicrobium* sp., y *Microbacterium paraoxydans* (2 cepas), bajo el supuesto de que al estar expuestas a ambientes con altos niveles de toxicidad las bacterias contarían con diversas estrategias para garantizar su supervivencia, como el biocontrol. Los dos hongos aislados y caracterizados fueron antagonizados en un 100% por las 5 cepas bacterianas.

Palabras clave: *Agave potatorum*; antagonismo; bacterias cianotróficas; control biológico; fitopatógenos.

CC BY NC SA

ABSTRACT

Agave potatorum is an important crop for mezcal production in Puebla, whose monoculture planting has expanded on a large scale since the denomination of origin was obtained. In October 2022, in the municipality of Tecali de Herrera, Puebla, field research observed and sampled 1.5-year-old *Agave potatorum* plants with symptoms of fungal infection: yellowing foliage, wilting, and reduced growth. From the infected plants, 2 strains of phytopathogenic fungi were isolated and identified morphometrically, morphologically, culturally, and molecularly (ITS): *Alternaria alternata* and *Fusarium sporotrichioides*. Subsequently, as a treatment alternative, the antagonistic potential of 5 strains of cyanotrophic bacteria isolated from mine tailings was tested: *Brevundimonas vesicularis*, *Bacillus cereus*, *Cellulosimicrobium* sp., and *Microbacterium paraoxydans* (2 strains), under the assumption that when exposed to environments with high levels of toxicity the bacteria would have various strategies to ensure their survival, such as biocontrol. The two fungi isolated and characterized were 100% antagonized by the 5 bacterial strains.

Keywords: *Agave potatorum*; antagonism; cyanotrophic bacteria; biological control; phytopathogens.

INTRODUCCIÓN

Los agaves de México han sido de gran importancia económica y cultural para diversos pueblos indígenas pues se han utilizado como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, textiles, abono, implementos agrícolas y principalmente para la producción de distintos tipos de bebidas alcohólicas como el mezcal y el tequila [1], que ha continuado hasta nuestros días y su producción se ha extendido en diferentes comunidades de México [2]. Específicamente, el mezcal es un producto con denominación de origen mexicano, lo que significa que su propiedad intelectual está protegida en distintos municipios pertenecientes a los estados de México: Durango, Guanajuato, Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, Puebla, Tamaulipas y Zacatecas. En la actualidad, la elevada demanda del mezcal en el mundo ha conducido a altas tasas de extracción de la materia prima. En su informe estadístico del 2024, el Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM), estableció que en el 2023 se produjeron 12,239,655 litros de mezcal de los cuales 7,829,669 litros fueron envasados para mercado de exportación y el restante se envasó para el mercado nacional, generando 55,000 empleos directos y 210,000 indirectos [3].

Dadas las condiciones ambientales de los diferentes estados de la República Mexicana que cuentan con denominación de origen para la producción de mezcal, existen diversas especies del género *Agave* útiles para tal propósito. En el territorio nacional existen un total de 159 especies de *Agave*, que representan

CC BY NC SA

el 75% del total de especies del género en todo el mundo, y de estas, se conoce que 125 son potenciales para la elaboración de la bebida [4]. Sin embargo, a pesar de contar con una alta diversidad, el 95.44% del mezcal se obtiene a través de solo 8 especies de *Agave*, con un claro predominio por el uso del *Agave angustifolia* o "maguey espadín" con el 86.31% seguido por el *Agave potatorum* o "maguey tobalá" con el 2.24% de la producción del mezcal [3], lo que representa una marcada tendencia hacia su producción a través de monocultivos.

En cuanto a la producción en el estado de Puebla, se consiguió la denominación de origen en el año 2015 [5], dando comienzo a la explotación del género, siendo el *Agave potatorum* la especie endémica mayormente explotada en la región [6], lo cual resulta controversial si se toma en cuenta que la bebida puede obtenerse de más de 50 especies de *Agave* [7], Esto representa una fuerte problemática ambiental, pues si bien el mezcal ha mostrado ser un producto de desarrollo social y económico, los efectos ambientales de su extracción en monocultivo han comenzado a vislumbrarse. Ejemplo de ello es lo ocurrido en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, en donde la fiebre por el *Agave* para la elaboración artesanal del mezcal ha conducido a la erosión del suelo y a la pérdida de biodiversidad en el sitio [8]. También, en 2019, en la Cuarta Reunión Nacional de Manejadores de Maguey Forestal, se reportó que, el extender los monocultivos de *Agave* promueven el cambio de uso de suelo mediante la deforestación y la desaparición total de la vegetación natural, generando distintos problemas fitosanitarios [8]. Esta práctica de producción de mezcal reduce además la diversidad no solo del género sino de la vegetación de la región y está documentado que la pérdida de diversidad de un ecosistema se asocia con una menor estabilidad y pérdida de funciones, como el biocontrol, lo que incrementa la susceptibilidad de las especies remanentes al ataque de plagas [9] a diferencia de cultivos rotativos [10] o mixtos [11]. Así mismo, es sabido que un ecosistema agrícola propenso a plagas e infecciones puede desaparecer y/o la perder productividad o la calidad del producto. Para evitarlo, se ha recurrido al empleo de agrotóxicos, que han demostrado solucionar el problema, pero solo en el inicio, pues su uso constante, así como su mala aplicación, pueden provocar resistencia a dichas plagas y toxicidad sobre diferentes especies no objetivo [12]. De manera específica, las infecciones de cultivos causadas por hongos resultan de interés, pues su capacidad de reproducirse sexual y asexualmente, en conjunto a sus adaptaciones epigenéticas y genómicas, permite una rápida evolución frente a entornos cambiantes lo que facilita el desarrollo de resistencia a antifúngicos [13]. Por lo que un diagnóstico temprano y preciso reduciría la propagación del patógeno en concreto, el uso de productos químicos y las pérdidas de rendimiento asociadas a las infecciones [14].

Por otra parte, como una alternativa al uso de agrotóxicos, se han desarrollado y utilizado técnicas de control biológico que intentan

CC BY NC SA

imitar lo que ocurre de manera natural en los ecosistemas. Entre estas técnicas se encuentra el antagonismo microbiano, el cual consiste en el uso de microorganismos que interactúan con el patógeno para reducir su efecto o virulencia. El empleo de microorganismos para el control de patógenos cuenta con casos exitosos como el reportado por Trinidad-Cruz *et al*. [15] en donde se ejerció biocontrol sobre *Fusarium oxysporum*, que causa síntomas de enfermedad sobre *A. cupreata*, a través del empleo de hongos micorrícicos arbusculares los cuales lograron disminuir hasta un 33% la severidad de la marchitez del *Agave*. Otro ejemplo es el reportado por Guerra-Camacho *et al*. [16] en donde mediante el aislamiento de bacterias halófilas provenientes de suelos salinos de Campeche, se encontró actividad antifúngica, principalmente del género *Bacillus* spp. contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Por su parte, debido a la afección de la producción de trigo por *Fusarium proliferatum*, se estudió el efecto del consorcio de bacterias rizosféricas aisladas de plantas de fresa*: Pseudomonas mediterranea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus*, demostrando que no solo antagonizaron el 70% del crecimiento de *F. proliferatum* sino que también maximizaron el crecimiento de los cultivos de trigo en el Bajío de México [17], por lo tanto, el control de hongos a través de bacterias es una interacción exitosa en el ámbito agrícola.

Actualmente los mecanismos de biocontrol suelen llevarse a cabo tanto por microorganismos nativos como por los llamados exóticos o foráneos. En cuanto al uso de estos últimos, se intenta encontrar funciones de microorganismos que han sido aislados e identificados con otros fines y que pueden ser útiles ante la problemática planteada, explotando su múltiple potencial benéfico. Para este estudio, se contó con microorganismos cianotróficos aislados de relaves mineros, cuyo potencial ha sido probado en la resistencia, biodegradación y asimilación de altas concentraciones de cianuro [18], pero que no han sido explorados en interacciones con patógenos microbianos de plantas.

Teniendo en cuenta lo anterior, el principal propósito de este trabajo fue identificar los hongos patógenos que actualmente infectan cultivos de *Agave potatorum* destinados a la producción de mezcal en el estado de Puebla y que pueden mermar su productividad. Posteriormente, se busca proponer su biocontrol mediante el uso de bacterias cianotróficas aisladas de relaves mineros a través de pruebas de antagonismo, con el fin de encontrar una opción de tratamiento y conservar la población de *A. potatorum* infectada con hongos patógenos.

METODOLOGÍA

Colecta de muestras y aislamiento de los hongos fitopatógenos

En el mes de octubre de 2022 se realizó un muestreo de campo en Tecali de Herrera, Puebla, México (18.82755º N, 9794027º W; 18.82748º N, 97.94015º W), en dos áreas de aproximadamente 15 ha de cultivo comercial de

CC BY NC SA

Agave potatorum con plantas de 1.5 años. El muestreo fue de tipo cualitativo, es decir, se seleccionaron aquellas plantas con síntomas de infección: follaje amarillento, marchitez y reducción en el crecimiento. Se colectaron y trasladaron para su análisis en laboratorio un total de 20 plantas sintomáticas, 10 por cada sitio de muestreo. Cada hongo fitopatógeno se aisló de acuerdo con Xia (modificado) en 2021 [19]: de las 10 plantas sintomáticas, se cortaron fragmentos (5 mm^2) de tejido del síntoma de la hoja y de las raíces necrosadas (5 mm), se desinfectaron con NaClO al 3% durante 1 minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril y se sembraron con pinzas estériles en cajas Petri que contenían agar papa dextrosa (PDA), éstas se incubaron a 25 °C ± 1 °C en oscuridad durante 12 días. Finalmente se obtuvieron dos aislamientos con el método de punta de hifa.

Caracterización morfométrica, morfológica y cultural

Las variables determinadas a los diferentes aislamientos fueron: forma de crecimiento y coloración del micelio, forma color y tamaño de los conidios macro y microconidios.

Pruebas de patogenicidad

Se identificaron dos hongos de acuerdo con la caracterización morfométrica, morfológica y cultural: *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. La confirmación de la patogenicidad de ambos fue conducida de manera similar a través de los postulados de Koch. Para *Alternaria* spp., la patogenicidad se confirmó mediante la inoculación de cinco hojas de cinco plantas (n=25) de *Agave potatorum* de 1.5 años en etapa vegetativa cultivadas en macetas con suelo estéril. Se depositó una alícuota de 20 µL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} sobre las hojas. Como tratamiento control, se aplicaron 20 µL de agua destilada estéril a cinco hojas de dos plantas (n=10). Para *Fusarium* spp., la patogenicidad se confirmó mediante la inoculación de 10 plantas de *Agave potatorum* de un año en etapa vegetativa cultivadas en macetas con suelo estéril. Se depositó un alícuota de 20 µL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} entre el tallo basal de la planta y la rizosfera. Como tratamiento control, se aplicaron 20 µL de agua destilada estéril a cinco plantas.

Para los dos tratamientos, las plantas inoculadas y control se colocaron en un invernadero a 25 ± 1 °C y 90 % de humedad relativa. Las pruebas de patogenicidad se repitieron tres veces.

Caracterización molecular

Se eligieron dos aislamientos representativos de cada hongo fitopatógeno para la identificación molecular y se extrajo el ADN genómico mediante el protocolo bromuro de cetiltrimetilamonio [20]. El ADN fue enviado a Macrogen Inc. (Seoul, Korea) para la amplificación y secuenciación de la región espaciadora interna transcrita ITS de acuerdo con White *et al*. [21] con los oligonucleótidos ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) e ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′).

CC BY NC SA

Las secuencias obtenidas (540 pb) fueron editadas con MEGA11 V.11.0.13 y alineadas a través de BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), con las secuencias de los aislamientos de la base de datos con 99% de similitud se obtuvo una secuencia consenso que fue nuevamente alineada con BLAST y se determinó la identidad de los hongos. Las secuencias con el 100% de similitud fueron subidas al GenBank a través de la herramienta BankIt (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/) y se solicitó el número de acceso.

Análisis de la capacidad antagonista de bacterias cianotróficas

Se utilizaron cinco cepas de bacterias cianotróficas seleccionadas aleatoriamente de un total de 23 aislados de una presa de relaves mineros, en Guanajuato, México bajo la metodología indicada en la NOM 004 SEMARNAT 2002 por Alvarado-López *et al*. [18]. Al momento de la experimentación se desconocía la identidad de las cepas, sin embargo, la identificación hecha por Alvarado López en 2023, indicó que se trataban de: *Brevundimonas vesicularis*, *Bacillus cereus*, *Cellulosimicrobium* sp., y dos cepas de *Microbacterium paraoxydans*.

Previo a los ensayos de antagonismo, se realizó la selección del medio de cultivo donde se ensayó el antagonismo, de tal forma que los dos tipos de microorganismos pudieran crecer exitosamente. Los hongos aislados y las bacterias cianotróficas fueron inoculados en placas de medio sólido Luria Bertani (LB) y en agar papa dextrosa (APD) y se monitoreo el crecimiento por 7 días, tiempo en que el hongo dejó de crecer.

La capacidad antagonista de las bacterias sobre los hongos patógenos se llevó a cabo mediante la metodología de agar de doble capa descrita por Muñoz-Rojas *et al*. [22]. Brevemente, las bacterias crecieron a través de un inóculo en medio líquido Luria Bertani (LB) por un periodo de 24 h, transcurrido este tiempo se cuantificaron las UFC/mL a través de la técnica de goteo en placa y se tomaron alícuotas de 50 µl que fueron depositadas y esparcidas para su crecimiento en placas de medio sólido LB por 24 h. Transcurrido este tiempo, la masa bacteriana fue retirada con un portaobjetos estéril y las bacterias remanentes fueron eliminadas a través de vapores de cloroformo con la placa invertida por un período de 1 hora. Posteriormente las placas fueron ventiladas en condiciones de esterilidad para eliminar el cloroformo restante. Las placas libres de bacterias y cloroformo fueron inoculadas con los hongos fitopatógenos con ayuda de un sacabocados de 5 mm de diámetro. La capacidad antagónica se determinó midiendo diariamente el diámetro del hongo patógeno de *Agave*. El crecimiento se determinó cada 24 h y correspondió al aumento radial (aumento de longitud) del hongo en la caja Petri y se obtuvo mediante la siguiente ecuación.

$$\boldsymbol{Crecimiento\ (i+24h)} = \frac{(\boldsymbol{D_{(i+24h)}} - \boldsymbol{D_i})}{\boldsymbol{2}}$$

CC BY NC SA

Donde

i = 0 h, 24 h, 48 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h y

D = Diámetro del hongo.

La inhibición se determinó al séptimo día con la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{Crecimiento_{control} - Crecimiento_{tratamiento}}{Crecimiento_{control}}$$

Todos los ensayos fueron realizados con un control, es decir, se llevó a cabo todo el protocolo descrito por Muñoz-Rojas, pero sin inóculo bacteriano.

RESULTADOS

Aislamientos, patogenicidad y caracterización de los hongos fitopatógenos

En los dos sitios de muestreo, se encontraron plantas de 1.5 años en etapa vegetativa, con síntomas en el follaje de amarillamiento, marchitez generalizada y reducción del crecimiento. En las raíces se observó pudrición blanda y necrosis, éstas se desprendían fácilmente de la planta, se determinó una incidencia de la enfermedad de 40%. En otras plantas, se identificaron en las hojas lesiones necróticas circulares, rodeadas de un halo púrpura, esparcidas por todas partes de las hojas infectadas, las lesiones necróticas continuaron expandiéndose, formando estructuras irregulares al unirse, con presencia de cadenas concéntricas de conidios negros, finalmente se observó defoliación, con una incidencia y severidad estimada de 40%.

De cada planta enferma se obtuvieron dos aislamientos, consiguiendo un total de 20 aislamientos de cada hongo fitopatógeno. Cuando los hongos fueron inoculados en plantas sanas, todas mostraron síntomas similares a los observados en el campo, a los 12 días para el que posteriormente fue identificado como *Alternaria* spp. y 16 días para el posteriormente identificado como *Fusarium* spp., mientras que no se observaron síntomas en los controles. Los hongos se volvieron a aislar de las plantas inoculadas como se describe anteriormente, cumpliendo con los postulados de Koch.

Los hongos aislados se identificaron morfométrica, morfológica y culturalmente como *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. El 100% de los aislamientos de *Alternaria* spp., presentaron micelio algodonoso de color blanco que posteriormente se tornó marrón oscuro. Se observaron conidios en cadenas simples o ramificadas. Estos conidios eran obclavados, elípticos, con septos transversales o longitudinales y median 17.3 a 40.8 µm de largo y de 7.9 a 14.9 µm de ancho (n=100). De acuerdo con la morfología de la colonia y los conidios, los aislamientos se identificaron como *Alternaria alternata* [23]. Por otra parte, el 100 % de los aislamientos de *Fusarium* spp. presentaron micelio esponjoso de color blanco rosado de rápido crecimiento. Se observaron abundantes microconidios, hialinos, ovalados a fusiformes, de paredes delgadas, que median 7.9 a 10.8 µm de largo y de 2.4 a 3.9 µm de ancho (n=100), mientras que los macroconidios fueron hialinos, de paredes gruesas,

CC BY NC SA

falciformes, de cinco a siete septos, que median 25.5 a 37.2 µm de largo y de 4.2 a 6.5 µm de ancho (n=100). Con base en las características morfológicas, los aislamientos fueron identificados presuntivamente como *Fusarium sporotrichioides* [24].

Identificación molecular

El análisis de las secuencias nucleotídicas con BLAST confirmó la identidad de las especies de los dos hongos aislados. Las secuencias de un aislamiento representativo (Aa-7) mostraron 100% de similitud (506 pb) con los asilamientos de *A*. *alternata* de la base de datos (GenBank: ON705514, MW009043). En el caso de *Fusarium sporotrichioides*, el análisis BLAST del aislamiento representativo Fs-3, mostró un 100% de similitud (497 pb) con los secuencias nucleotídicas de aislamientos de *F. sporotrichioides* de la base de datos (GenBank: KU935671, FJ614629). Las secuencias con el 100% de similitud se depositaron en el GenBank con los números de acceso PQ361289 y PQ361304, para *A. alternata* y *F. sporotrichioides* respectivamente.

Análisis de la capacidad antagonista de bacterias cianotróficas

Las cinco cepas bacterianas: *Brevundimonas vesicularis, Bacillus cereus, Cellulosimicrobium* sp. *y dos cepas de Microbacterium paraoxydans* y los dos hongos fitopatógenos previamente identificados: *Alternaria alternata* y *Fusarium sporotrichioides* mostraron crecimiento en el medio LB, no así en el de PDA, donde se observó un mejor crecimiento de los hongos, pero nulo de las bacterias. Es necesario mencionar que el crecimiento de los hongos en medio LB se retrasó en comparado con PDA, en donde los hongos llenaban la caja Petri en un periodo de 6 días.

La concentración de la suspensión bacteriana inoculada en la placa, en UFC/mL, fue la siguiente para cada bacteria: 1.65×10^9 para *Cellulosimicrobium* sp., 1.1×10^9 para *Brevundimonas vesicularis,* 1.15×10^9 y 1.2×10^9 para las dos cepas de *Microbacterium paraoxydans*. La concentración de *Bacillus cereus* no se pudo determinar debido a su crecimiento acelerado en placa. Las bacterias de la suspensión inoculadas en el medio sólido LB, tardaron 24 horas en crecer en toda la placa.

El antagonismo se midió durante un período de 7 días dado que fue el tiempo en que cada hongo creció en la placa, transcurrido este tiempo no se observó mayor crecimiento. Como puede observarse en la tabla 1 los hongos no mostraron crecimiento en placas donde previamente crecieron las bacterias, sin embargo, en las placas control (sin bacteria) existió un crecimiento notable, el máximo crecimiento, es decir, el aumento de su radio, ocurrió de las 72 a las 96 horas en donde para ambos hongos. En cuanto al porcentaje de inhibición, todas las bacterias inhibieron al 100% el crecimiento de los dos hongos, como se puede observar en la figura 1 en donde no se observa crecimiento fúngico en las placas donde previamente crecieron las bacterias.

CC BY NC SA

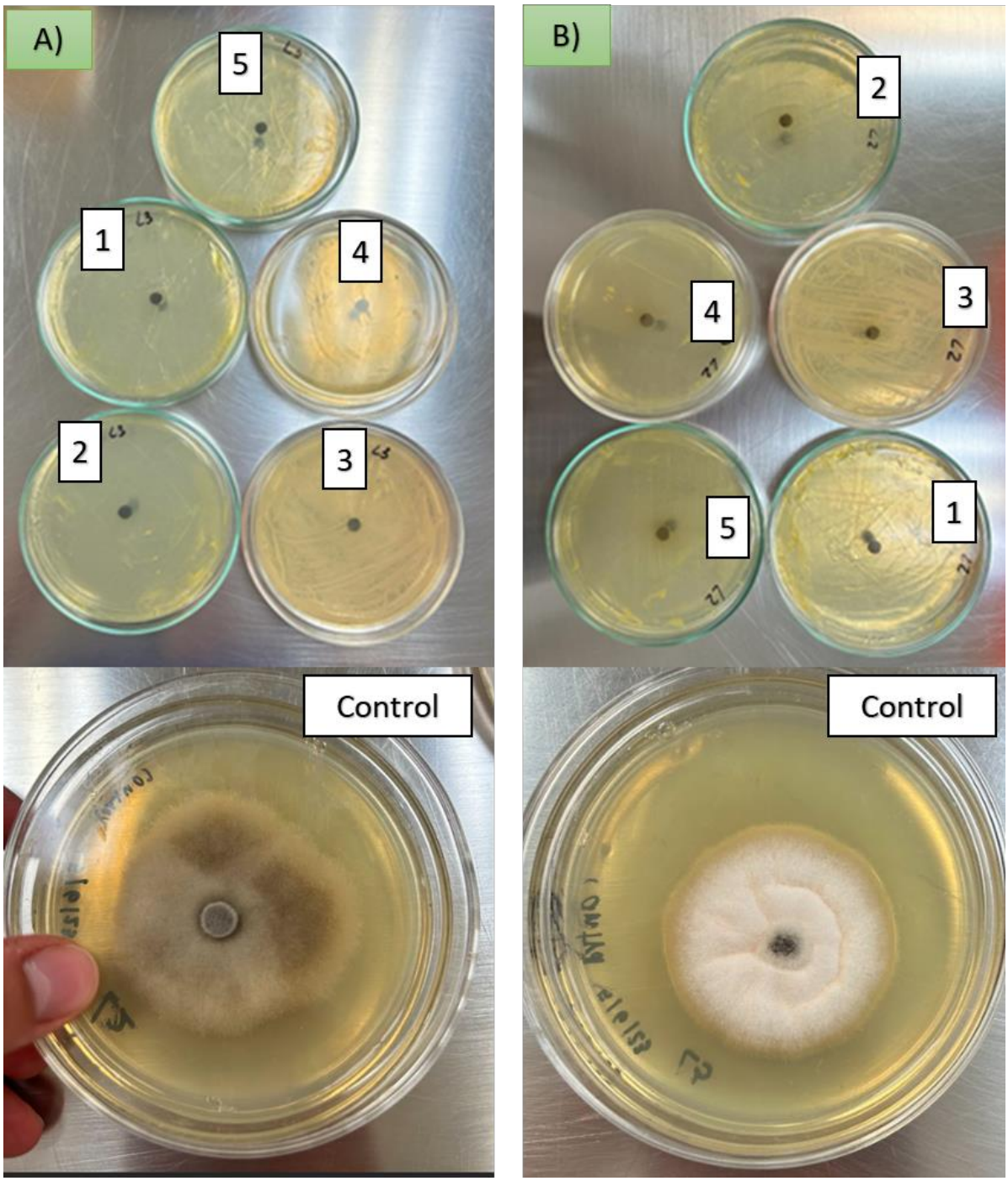

Figura 1. Crecimiento de A) *A. alternata* y B) *F. sporotrichioides* en placas de medio LB con diferentes tratamientos, del 1 al 5 corresponden a placas donde previamente fueron crecidas y eliminadas 1) *Cellulosimicrobium* sp., 2) *Brevundimonas vesicularis*, 3) *Bacillus cereus* 4 y 5) *Microbacterium paraoxydans*.

Tabla 1. Crecimiento en milímetros de *A. alternata* y *F. sporotrichioides* en placas de medio LB. Tratamiento del 1 al 5, corresponden a placas donde previamente se crecieron por 24 h y se eliminaron bacterias: 1) *Cellulosimicrobium* sp, 2) *Brevundimonas vesicularis*, 3) *Bacillus cereus* 4 y 5) *Microbacterium paraoxydans* y Control, corresponde al crecimiento del hongo en placas de medio LB sin crecimiento previo de bacterias. Cada dato corresponde al promedio de 2 repeticiones con su respectiva desviación estándar.

Fitopatógeno	***Alternaria alternata***						***Fusarium sporotrichioides***					
Tiempo (h)	**Crecimiento (mm)**											
	Tratamiento						Tratamiento					
	1	2	3	4	5	Control	1	2	3	4	5	Control
24	0	0	0	0	0	1.6 ±0.4	0	0	0	0	0	1.5 ±1.04
48	0	0	0	0	0	4.7 ±0.3	0	0	0	0	0	3.9 ±0.5
72	0	0	0	0	0	4.9 ±0.6	0	0	0	0	0	4.1 ±2.3
96	0	0	0	0	0	8.6 ±0.04	0	0	0	0	0	6.7 ±1.7
120	0	0	0	0	0	2.4±0.4	0	0	0	0	0	2.3±0.01
144	0	0	0	0	0	0.7±0.1	0	0	0	0	0	0.9 ±0.7
168	0	0	0	0	0	1.1 ±0.5	0	0	0	0	0	1.2 ±0.7

DISCUSIÓN

Los géneros de los hongos *Alternaria alternata* y *Fusarium sporotrichioides*, aislados e identificados en plantas de *Agave potatorum* recolectadas en el municipio de Tecali de Herrera, en Puebla, México, ya han sido reportados previamente como patógenos del género *Agave*. Se ha documentado la presencia de *Alternaria alternata* en Irán [25] e India [26], sobre *Agave americana* causando manchas foliares, y en Irán es el principal patógeno de *Agave*, en donde ha causado pérdidas de hasta el 90% y 95% en cultivos de *Agave*. En México, se ha reportado a *Alternaria* como agente causal de la pudrición de *Agave potatorum Zucc* [27] así como se corrobora en este estudio, así mismo, se ha reportado como agente causal de la pudrición de *Agave tequilana Weber* [28] y en *Agave cupreata* [29]. En la planta de *Agave* estudiada en este trabajo, solo se observaron manchas necróticas foliares. A diferencia de los reportes existentes, la infección avanzó de la periferia hacia el centro, y no se detectó marchitez de color rojizo-marrón en la raíz. Estas diferencias podrían deberse a que, aunque en México se han reportado casos del género *Alternaria* con plantas de agave, hasta la fecha no existen registros específicos de la interacción de *Alternaria alternata* como patógeno de *Agave potatorum*, por lo que sería de interés investigar el mecanismo de la interacción, de tal forma que pueda ser comparado con lo reportado en otras especies de *Agave*.

En cuanto a *Fusarium,* diferentes especies pertenecientes al género han sido reportadas como patógenos de *Agave*, siendo la principal *F. oxysporum* en plantas de *Agave tequilana* [30, 31] y *Agave americana* [32] causantes de putrefacción de las plantas. También, se ha identificado a *Fusarium solani*, *Fusarium*

incarnatum [33] y *Fusarium* sp. [27] como patógenos de *Agave potatorum* en etapa de vivero, causando pudrición seca. De igual forma, mediante infección inducida se ha demostrado que especies de *Fusarium* pueden causar necrosis en Agave, como el caso de la inoculación de *F. solani* en *Agave tequilana* [30]. Esto demuestra la afinidad del género fúngico con las plantas de *Agave*, sin embargo, a la fecha, no existen reportes de *Fusarium sporotrichioides* como patógeno de plantas de *Agave*, aunque si como patógeno de soya [34], alfalfa [35] y como endófito de arbustos [36]. La infección mostrada por *F. sporotrichioides* en la planta de *Agave potatorum* se observó mediante un cambio de color a verde pardo en al menos la mitad del total de las hojas además de pérdida de anclaje al suelo por la pudrición de la raíz. Dichos síntomas fueron parecidos a los reportados en *Agave* afectado por *F. oxysporum* [37], particularmente en la tonalidad de las hojas y el debilitamiento general de la planta. *F. oxysporum* se caracteriza por penetrar a través de las raíces del hospedero y causar daños que alcanzan el xilema, lo que explica la marchitez observada y la facilidad con la que la planta enferma pudo ser retirada en campo para su análisis.

En cuanto a las pruebas de antagonismo, el nulo crecimiento de *Alternaria alternata* y *Fusarium sporotrichioides* en las placas donde previamente crecieron las cinco cepas de bacterias cianotróficas comparado con el crecimiento observado en las placas control, demostró su capacidad antagónica. Cabe recordar que al momento de las pruebas de antagonismo se desconocía la identidad de las cepas bacterianas. Una vez conocida su identidad, los resultados coinciden con lo reportado por Méndez-Úbeda *et al*. [38], que probaron que *Bacillus cereus* inhibe el crecimiento de *A. alternata y Fusarium* sp., entre un 90 y 100%, para ambos hongos. Sin embargo, en el mismo estudio se encontró que para otra cepa de *Fusarium* sp., la inhibición fue menor al 45%. La diferencia en los porcentajes de inhibición parece ser especie específica, pues es bien conocido que *Bacillus cereus* es un excepcional antagonista de hongos patógenos, pues ha mostrado actividad antimicrobiana en *Aspegillius niger* [39], *Fusarium exosporium* [40], *Fusarium verticillioides* [41], y diversas especies de *Penicillium* [42], entre otros y ahora en *Fusarium sporotrichioides*. Dentro de los mecanismos de acción de la actividad antimicrobiana de *Bacillus cereus* se encuentra la producción de quitinasa [43], hidrolasas y surfactantes [39, 44].

Por su parte, el género *Cellulosimicrobium* es conocido por ser también productor de compuestos antifúngicos. *Cellulosimicrobium* sp. antagoniza el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Verticillium dahliae* además de que se han identificado varios rasgos promotores de crecimiento vegetal y producción de enzimas beneficiosas para la fertilidad del suelo [45].

Por otro lado, en pruebas de antagonismo con *B. vesicularis* se demostró su potencial para inhibir el crecimiento de *Fusarium redolens*, causante de la marchitez en garbanzo, por más del 85.5% [46]. Se ha reportado que la

CC BY NC SA

producción de quitinasa por microorganismos del género *Brevundimonas*, inhibe el crecimiento de *Fusarium solani* y *A. alternata,* a través de la degradación de su pared celular ocasionando lisis celular [47]. Con lo que respecta a *Microbacterium paraoxydans*, se ha comprobado su actividad antagónica frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* aislado del cultivo de garbanzo en la India pues inhibió en un 69.38% el crecimiento micelial [48] y sobre *F. oxysporum* y *F. solani*, en crecimiento simultáneo con la bacteria [49]. Otras especies del género han mostrado biocontrol sobre *Fusarium fujikuroi* [50]. En cuanto a la inhibición de *Alternaria alternata*, en un ensayo similar de biocontrol con *Microbacterium paraoxydans* aislada de plantas de tomate, se probó que la bacteria inhibía alrededor de un 40% el crecimiento del hongo cuando se crecían en conjunto, hasta en un 80% cuando se utilizaban los compuesto orgánicos volátiles (COVs) producidos por la bacteria y ningún efecto cuando se utilizaba el supernadante del medio donde se creció la bacteria [51], sin embargo, la cepa que nosotros probamos inhibió en un 100% el crecimiento de *A. alternata.* Estos datos son de gran interés, pues a diferencia de López *et al*., [51] el ensayo de antagonismo que conducimos fue en crecimiento en solitario y en medio LB, a diferencia de ellos, que utilizaron medio nutritivo para el crecimiento en conjunto y medio TYB para obtener los COVs y el supernadante, lo que podría indicar que si bien existe inhibición por parte de *M. paraoxydans* ésta se verá expresada por los nutrientes suministrados. Además, también indicaría diferentes compuestos inhibidores, pues en el ensayo de López y cols., los compuestos producidos que inhiben el crecimiento del hongo son volátiles y en nuestro experimento no pueden ser volátiles pues en el protocolo utilizado, las placas donde crecieron las bacterias se airean por un periodo de 1 h antes de sembrar al hongo. Esta diferencia podría ser debida al tamaño poblacional y la etapa de crecimiento de la bacteria, pues en su caso alcanzaron 1×10^4 UFC/mL en 5 días y nosotros 1.2×10^9 UFC/mL en 24 h

Es importante resaltar que además de su potencial antagónico, todas las especies bacterianas han mostrado cualidades benéficas en cuanto al crecimiento vegetal, por mencionar algunas, *M. paraoxydans* produce ácido indol acético y solubiliza fosfatos [49] al igual que *Brevundimonas* [46] y *Bacillus cereus* [52]. Por su parte, cepas de *Cellulosimicrobium* sp. han incrementado la absorción de N [53]. Estas características aumentan el valor ecológico de las cepas bacterianas para aplicación en el control de patógenos de *Agave* y su posible uso en la promoción de crecimiento vegetal en el caso de su aplicación directa. Además, aunque su uso podría ser directo, otra ventaja es que las cepas demostraron una producción constitutiva de compuestos antagónicos, ya que no requirieron de la presencia del patógeno para generarlos. También, destaca la resistencia y adaptación de estas cepas a sistemas hostiles como los relaves mineros, lo cual facilitaría su adaptación a nuevos ambientes si fuera necesario. Por otro lado, de acuerdo con la

CC BY NC SA

literatura, se podría deducir que los compuestos producidos incluyen hidrolasas y quitinasas; sin embargo, es necesario un estudio más profundo y detallado para su identificación precisa. En este sentido, el presente estudio abre la puerta para la producción e identificación de compuestos antifúngicos.

CONCLUSIÓN

Tras el muestreo de plantas de *Agave potatorum* que mostraron síntomas de enfermedad, se identificó la presencia *Alternaria alternata* y *Fusarium sporotrichioides*, la patogenicidad de ambos hongos fue comprobada en plantas sanas de *Agave potatorum.* Si bien *Alternaria alternata* ya fue reportado como patógeno de *Agave potatorum*, es la primera vez que se encuentra a *Fusarium sporotrichioides* como patógeno de la especie, no así del género. La importancia de la identificación de estos hongos en monocultivos de *Agave* para la producción de mezcal en el municipio de Tecali de Herrera Puebla, radica en que se puede dar un tratamiento específico a las plantas infectadas sin mermar la diversidad fúngica del suelo. Además, fue probado el potencial de cepas cianotróficas: *Brevundimonas vesicularis*, *Bacillus cereus*, *Cellulosimicrobium* sp., y *Microbacterium paraoxydans,* como antagonistas de hongos que infectan *Agave*, incrementando su potencial biotecnológico, en este caso como coadyuvantes en la conservación de la población de *A. potatorum*.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen relaciones económicas o de otra índole que podrían conducir a un conflicto de intereses desde distintos tipos de relaciones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación de la UPAEP por el respaldo para la realización del presente trabajo y al Centro de Investigación en Horticultura y Plantas Nativas de la UPAEP, por las facilidades para llevar a cabo parte de los ensayos. La Dra. Ligia Catalina Muñoz-Arenas y el Dr. José Terrones-Salgado son miembros del SNII y agradecen su actual distinción. También, agradecemos a la Dra. María José Alvarado-López por la donación de las cepas bacterianas.

REFERENCIAS

[1]. Pérez E, Chávez M, González J. Revisión del Agave y el mezcal. Rev. Colomb. Biotecnol. 2016; 18(1): 148-164. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/66706

[2]. Gschaedler A, Mora A, Contreras S, Vázquez G, Valdez J, Villareal S, *et al*. Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México. México: Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves. 2017. CIATEJ. Disponible en: https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/

handle/1023/646

[3]. Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal. Informe Estadístico 2024, COMERCAM Mezcal. México: Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (COMERCAM). 2024. Disponible en: https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2024/04/PUBLICO_INFORME_2024.pdf

[4]. Palma F, Pérez P, Meza V. Diagnóstico de la Cadena de Valor Mezcal en las Regiones de Oaxaca. México: Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para el Desarrollo de Oaxaca. 2016. Disponible en: https://docslib.org/doc/1287903/diagn%C3%B3stico-de-la-cadena-de-valor-mezcal-en-las-regiones-de-oaxaca

[5]. Extracto de la solicitud para modificar la Declaración General de Protección de la denominación de origen mezcal. Diario Oficial de la Federación (DOF), (24 de diciembre del 2015). Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/695080/6.Mezcal.24.12.2015.pdf

[6]. Benítez-García E, Jaramillo-Villanueva JL, Vargas-López S, Bustamante-González Á. Mezcal artesanal en Puebla: actores y saberes locales. ASyD. 2024; 21(3): 330–347. Disponible en: https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9637598

[7]. Alducin-Martínez C, Ruiz Mondragón KY, Jiménez-Barrón O, Aguirre-Planter E, Gasca-Pineda J, Eguiarte LE, *et al*. Uses, Knowledge and Extinction Risk Faced by Agave Species in Mexico. Plants. 2023; 12(1): 124. Disponible en: https://www.mdpi.com/2223-7747/12/1/124

[8]. Llaven Y. Fiebre por el Agave "oro azul" pone en riesgo la biodiversidad de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán. La Jornada de Oriente. 18 de enero del 2021. (Consultado el 4 de octubre del 2023). Disponible en: https://www.lajornadadeoriente.com.mx/puebla/fiebre-por-el-agave-oro-azul-pone-en-riesgo-la-biodiversidad-de-reserva-de-la-biosfera-tehuacan-cuicatlan/

[9] Altieri M, Nicholls C. Agroecología y resiliencia al cambio climático: principios y consideraciones metodológicas. Agroecología. 2013; 8(1): 7-20. Disponible en: https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/182921

[10]. Chadfield VGA, Hartley SE, Redeker KR. Associational resistance through intercropping reduces yield losses to soil-borne pests and diseases. New Phytol. 2022; 235: 2393-2405. Disponible en: https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nph.18302

[11]. Aman M. Impact of monocropping for crop pest management: Review. Acad Res J Agric Sci Res. 2020; 8: 447-452. Disponible en: https://academicresearchjournals.org/ARJASR/PDF/2020/June/Mohammed.pdf

[12]. Altieri M. Los impactos ecológicos de los sistemas de producción de biocombustibles a base de monocultivos a gran escala en América. Agroecología. 2009; 4: 59-67. Disponible en: https://revistas.um.es/agroecologia/article/view

CC BY NC SA

/117191

[13]. Fisher MC, Gurr SJ, Cuomo CA, Blehert DS, Jin H, Stukenbrock EH, *et al*. Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. 2020; mBio 11:10.1128/mbio.00449-20. Disponible en: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mbio.00449-20

[14]. Aragona M, Haegi A, Valente MT, Riccioni L, Orzal L, Vitale S, *et al*. New-Generation Sequencing Technology in Diagnosis of Fungal Plant Pathogens: A Dream Comes True? J. Fungi 2022, 8, 737. Disponible en: https://www.mdpi.com/2309-608X/8/7/737

[15]. Trinidad-Cruz J, Quiñones-Aguilar E, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L, Hernández-Cuevas L. Micorrización de *Agave cupreata*: Biocontrol de *Fusarium oxysporum* y promoción del crecimiento vegetal. RMF. 2017; 35(2): 151-169. Disponible en: https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1607-5

[16]. Guerra-Camacho M, Magaña-Tzuc M, Vargas-Díaz A, Silva-Rojas H, Gamboa-Angulo M. Identificación y actividad antifúngica de bacterias halófilas aisladas de suelos salinos en Campeche, México. RAM. 2024; 56(3): 298-311. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754124000233

[17]. Martínez Resendez EA. Efectividad del consorcio bacteriano formado por *Pseudomonas mediterránea*, *Pantoea antophila* y *Variovorax paradoxus*, para antagonizar al hongo productor de la secadera del trigo *Fusarium proliferatum* y su posible uso como bioinoculante. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México, marzo 2024. Disponible en: https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/10357

[18]. Alvarado M. Cyanide bioremediation using bacterial strains isolated from gold cyanidation tailings. Tesis de doctorado, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México. Mayo 2023.

[19]. Xia B, Liang Y, Hu JZ, Yan XL, Yin LQ, Chen Y, *et al*. First report of sea buckthorn stem wilt caused by *Fusarium sporotrichioides* in Gansu, China. Plant Disease. 2021; 105.12: 4156. Disponible en: https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-03-21-0627-PDN

[20]. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 1987; 19:11-15. Disponible en: https://worldveg.tind.io/record/33886/

[21]. White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gener for phylogenetics. En: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. United States of America: Academic Press Inc; 1990. 315-322. Disponible en: https://sci.bban.top/pdf/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.pdf

[22]. Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. FEMS Microbiol Ecol. 2005; 54(1): 57-66.

CC BY NC SA

Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168649605000668

[23]. Woudenberg J, Groenewald J, Binder M, Crous P. Alternaria redefined. Stud. Mycol. 2013; 75(1): 171-212. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016606161460004X

[24]. Leslie J, Summerell B. The *Fusarium* laboratory manual. United States of America: John Wiley & Sons; 2008. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470278376?msockid=2fa08a48afb36a8f2b698477ae916bb5

[25]. Mirhosseini H, Babaeizad V, Hashemi L, Basavand E, Heidari-Nezhad A. First record of Agave leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Iran. JPP. 2015; 97(1): 209-220. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279240996_First_record_of_agave_leaf_spot_caused_by_alternaria_alternata_in_Iran

[26]. Gautam A. Natural occurrence of *Alternaria alternata* on Agave americana: a report from Himachal Pradesh, India. J New Biol Rep. 2013; 2(1): 36-39. Disponible en: https://www.researchtrend.net/jnbr/VOL%202(1)%202013/8%20JNBR%202(1)%208.pdf

[27]. Bailón-Ortiz A, Amábilis-Sánchez M. Identificación de agentes causales de la pudrición seca de *Agave potatorum Zucc* en vivero. RMAE. 2024; 11(1). Disponible en: https://revistaremaeitvo.mx/index.php/remae/article/view/417

[28]. Ceballos-Álvarez A, Chávez-Díaz I, Zelaya-Molina L, Cruz-Cárdenas C, Mercado-Vargas T, Reséndiz-Venado Z. Identificación morfológica de hongos filamentosos aislados de diferentes síntomas asociados a Agave tequilero en Los Altos de Jalisco. CYTAM. 2022; 10(1): 60-69. Disponible en: https://www.somecta.org.mx/wp-content/uploads/2022/12/8hongosAgave.pdf

[29]. Morales-García J, Hernández A, Martínez-Palacios A. Identificación y medidas de control de las principales enfermedades que afectan al *Agave cupreata* en Michoacán. En: Martínez-Palacios, A. Aspectos sobre el manejo y conservación de Agaves mezcaleros en Michoacán. México; 2015. 15-28. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/295573233_Aspectos_sobre_manejo_y_conservacion_de_Agaves_mezcaleros_en_Michoacan

[30]. Ramírez-Ramírez M, Mancilla-Margalli N, Meza-Álvarez L, Turincio-Tadeo R, Guzmán-de Peña D, Ávila-Miranda M. Epidemiology of *Fusarium agave* wilt in *Agave tequilana* Weber var. azul. Plant Protect. Sci. 2017; 53(3): 144-152. Disponible en: https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/pps/2017/03/03.pdf

[31]. López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa M, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante V, Coria-Contreras J, *et al*. Morphological and molecular characterization of Fusarium spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud root in *Agave tequilana*. RMF. 2020; 38: 79-106. Disponible en:

CC BY NC SA

https://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v38n1/2007-8080-rmfi-38-01-79.pdf

[32]. Reyes-Zambrano S, Lecona-Guzmán C, Gutiérrez-Miceli F, Santana-Buzzy N, Islas-Flores I, Tzec-Simá M, *et al*. Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in *Agave americana* during *Fusarium oxysporum* infection. RMF. 2020; 38(3): 408-419. Disponible en: https://rmf.smf.org.mx/RevistaMexicana/articulo-hdoi.php?clave=RMF2005-3

[33]. Orozco-Duarte A. Diagnóstico fitosanitario, establecimiento y multiplicación in vitro de agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc.). Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México, junio 2023. Disponible en: https://repositorio.chapingo.edu.mx/items/7e1f9a49-bf92-47d0-a42d-b4d644e97bd7

[34]. Zhang C, Liu Z, Yang Y, Ma Q, Zheng Y, Xu C, *et al*. Characterization of *Fusarium* species causing soybean root rot in Heilongjiang, China, and mechanism underlying the differences in sensitivity to DMI fungicides. Pestic Biochem Physio. 2024; 200. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048357524000610

[35]. Pan LQ, Zhang L, Yang C, Yuan Q, Wang Y, Miao L. Identification and biological characteristics of *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Medicago sativa* root. Acta Prataculturae Sinica. 2015; 24(10): 88. Disponible en: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20153421952

[36]. Wang Y, Liu C, Yang Y, Li C, Pei Y. A new tetracyclic triterpenoid from endophytic fungus *Fusarium sporotrichioides*. CHM. 2024; 16(2): 231-234. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674638423000497

[37]. Servicio Nacional de Sanidad. Ficha técnica Marchitez del Agave (*Fusarium oxysporum*). México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria; 2003. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/244026/Ficha_T_cnica_Fusarium_oxysporum_en_agave_Versi_n_FINAL.pdf

[38]. Méndez-Úbeda J, Hernández M, Páramo-Aguilera L. Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo *in vitro* frente hongos fitopatógenos. Nexo rev. 2017; 30(2): 96-110. Disponible en: https://revistas.uni.edu.ni/index.php/Nexo/article/view/734

[39]. Yi Y, Hou Z, Yang Q, Cui L, Lu H, Li R, *et al*. Antimicrobial mechanism and biocontrol effect of *Bacillus cereus* XZ30-2 on *Aspergillus niger*. Qual Assur Saf Crops Food. 2023; 15(4): 77-88. Disponible en: https://qascf.com/index.php/qas/article/view/1379

[40]. Madriz-Ordeñana K, Pazarlar S, Jørgensen H, Nielsen T, Zhang Y, Nielsen K, *et al*. The *Bacillus cereus* strain EC9 primes the plant immune system for superior biocontrol of *Fusarium oxysporum*. Plants. 2022; 11(5): 687. Disponible en: https://www.mdpi.com/2223-

CC BY NC SA

7747/11/5/687

[41]. Báez-Astorga P, Cázares-Álvarez J, Cruz-Mendívil A, Quiroz-Figueroa F, Sánchez-Valle V, Maldonado-Mendoza I. Molecular and biochemical characterization of antagonistic mechanisms of the biocontrol agent *Bacillus cereus* B25 inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium verticillioides* P03 during their direct interaction *in vitro*. Biocontrol Sci Technol. 2022; 32(9): 1074-1094. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09583157.2022.2085662

[42]. Khadiri M, Boubaker H, Askarne L, Ezrari S, Radouane N, Farhaoui A, *et al*. *Bacillus cereus* B8W8 an effective bacterial antagonist against major postharvest fungal pathogens of fruit. Postharvest Biol Techno. 2023; 200. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521423000765

[43]. Huang C, Wang T, Chung S, Chen C. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. BMB Reports. 2005; 38(1): 82-88. Disponible en: http://koreascience.or.kr/article/JAKO200510103425860.page

[44]. Figueroa A. Caracterización de los mecanismos de antagonismo que emplea *Bacillus cereus* seleccionado para el control de *Fusarium verticillioides*. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, Abril 2016. Disponible en: http://www.rdcb.cbg.ipn.mx/handle/20.500.12273/692

[45]. Mirhosseini H, Babaeizad V, Hashemi L, Basavand E, Heidari-Nezhad A. First record of Agave leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Iran. JPP. 2015; 97(1): 209-220. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/279240996_First_record_of_agave_leaf_spot_caused_by_alternaria_alternata_in_Iran

[46]. Bekkar A, Zaim S. Newly isolated *Brevundimonas naejangsanensis* as a biocontrol agent against *Fusarium redolens* the causal of *Fusarium* yellows of chickpea. Folia Microbio. 2024: 1-12. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-023-01126-z

[47]. Warda E, Abeer A, Eman R, Mahmoud A, Ahmed I. Applications of Plackett–Burman and Central Composite Design for the Optimization of Novel *Brevundimonas diminuta* KT277492 Chitinase Production, Investigation of its Antifungal Activity. Braz Arch Biol Technol. 2016; 59. Disponible en: https://www.scielo.br/j/babt/a/SgWssdzvkDbMWBByxFfcXYw/

[48]. Khanna A, Raj K, Kumar P, Wati L. Antagonistic and growth-promoting potential of multifarious bacterial endophytes against *Fusarium* wilt of chickpea. Egypt J Biol Pest Control. 2022; 32(1): 17. Disponible en: https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-022-00516-8

[49]. Hernández-Pacheco C, Orozco-Mosqueda MC, Flores A, Valencia-Cantero E, Santoyo G. Tissue-specific diversity of bacterial

endophytes in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.), and screening for their multiple plant growth-promoting activities. Crr Res Microb Sci. 2021; 2. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666517421000092

[50]. Bosco S, Prencipe S, Mezzalama M, Spadaro D. Screening and characterization of bacterial and fungal endophytes as potential biocontrol agents for rice seed dressing against *Fusarium fujikuroi*. Biol Control. 2024; 196. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964424001452

[51]. López SMY, Pastorino GN, Balatti P.A. Volatile organic compounds profile synthesized and released by endophytes of tomato (*Solanum lycopersici* L.) and their antagonistic role. Arch Microbiol. 2021; 203(4):1383-1397. Disponible en: https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-020-02136-y

[52]. Kulkova I, Dobrzyński J, Kowalczyk P, Bełżecki G, Kramkowski K. Plant Growth Promotion Using *Bacillus cereus*. Int J Mol Sci. 2023; 24(11). Disponible en: https://www.mdpi.com/1422-0067/24/11/9759

[53]. Lobato-Ureche M. Efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento sobre la producción de plantines y de frutos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) cv. Calafyuco INTA para industria en Mendoza. Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina, septiembre 2023. Disponible en: https://bdigital.uncu.edu.ar/18663#:~:text=Efecto%20de%20la%20inoculaci%C3%B3n%20con%20bacterias%20promotoras%20del,Nacional%20de%20Cuyo.%20Facultad%20de%20Ciencias%20Agrarias%20