

Actividad Antifúngica de Bacterias Contra *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum* sp. que Afectan a la Fresa

Antifungal Activity of Bacteria Against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum* sp. Affecting Strawberry

Edith Garay-Serrano^{1,2*}, Paula Pérez Cupa¹

¹Instituto de Ecología, A.C. Red de Diversidad Biológica del Occidente Mexicano. Avenida Lázaro Cárdenas 253, 61600 Pátzcuaro, Michoacán, México. ²CONACYT. Avenida Insurgentes Sur 1582, 03940 Ciudad de México, México.

Autor de correspondencia*: edith.garay@inecol.mx

RESUMEN

México es el quinto productor a nivel mundial de fresa y el Estado de Michoacán el principal proveedor nacional, aportando más del 62% de esta fruta. Dos de los principales patógenos de la fresa son *Botrytis cinerea* causando pudrición de fruto y especies de *Colletotrichum* induciendo antracnosis. Debido a la necesidad de evaluar microorganismos nativos cultivables que puedan ser usados como control biológico, se planteó este trabajo que tiene como objetivo evaluar la capacidad antagónica que ofrecen bacterias de distintos géneros (*Bacillus*, *Gluconobacter*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*) contra los patógenos *B. cinerea* y *Colletotrichum* sp.) en confrontaciones *in vitro*. Los hongos se aislaron del fruto infectado y una vez purificados, fueron enfrentados en cultivos duales, contra las bacterias en medio de cultivo de PDA, obteniéndose el porcentaje de inhibición tras siete días de crecimiento. Las cuatro bacterias mostraron alta capacidad de inhibición: las especies de *Bacillus* aff. *siamensis* y *Streptomyces* aff. *daghestanicus*, fueron las que inhibieron en más de 80% el crecimiento del micelio de *Colletotrichum*, mientras que *Bacillus* aff. *siamensis* y *Gluconobacter cerinus* disminuyeron a *B. cinerea* en más del 79%. Este trabajo servirá para profundizar en el estudio y la evaluación de la actividad antifúngica de organismos para combatir patógenos del cultivo de fresa.

Palabras clave: Antracnosis, *Gluconobacter*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, moho gris.

INTRODUCCIÓN

La fresa se ha convertido en uno de los frutos más producidos y demandados en México y en el extranjero, debido a su olor, color, su sabor y por sus altos contenidos de

ABSTRACT

Mexico is the fifth largest strawberry producer in the world and the State of Michoacán is the main national supplier, providing more than 62% of this fruit. Two of the main strawberry pathogens are *Botrytis cinerea*, causing fruit rot and *Colletotrichum* species inducing anthracnose. Due to the need to evaluate native cultivable microorganisms that can be used as biological control, this work was proposed to evaluate the antagonistic capacity offered by bacteria of different genera (*Bacillus*, *Gluconobacter*, *Paenibacillus* and *Streptomyces*) against the pathogens *B. cinerea* and *Colletotrichum* sp. in *in vitro* confrontations. The fungi were isolated from the infected strawberry and once purified, they were confronted in dual cultures against the bacteria in PDA culture medium, obtaining the percentage of inhibition after seven days of growth. The four bacteria showed high inhibition capacity: *Bacillus* aff. *siamensis* and *Streptomyces* aff. *daghestanicus* inhibited the growth of *Colletotrichum* mycelium by more than 80%, while *Bacillus* aff. *siamensis* and *Gluconobacter cerinus* reduced *B. cinerea* by more than 79%. This work will serve to further study and evaluate the antifungal activity of organisms to combat strawberry crop pathogens.

Key words: Anthracnose, *Gluconobacter*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, gray molds.

INTRODUCTION

Strawberry has become one of the most produced and demanded fruits in Mexico and abroad, due to its smell, color, flavor and its high content of antioxidants (anthocyanins and flavonoids), in addition to providing vitamins C, D and anti-inflammatory properties, so this fruit is highly sought after by consumers (Giampieri et al., 2014).

antioxidantes (antocianinas y flavonoides), además de proveer de vitaminas C, D y propiedades antiinflamatorias, por lo que este fruto es muy buscado por los consumidores (Giampieri et al., 2014). La producción de fresa está considerada como una de las actividades más importantes dentro de la producción agrícola nacional y México, en 2023, ocupó el quinto lugar en producción mundial, sumando 641,552 toneladas y exportando el 57% de la fruta. El estado de Michoacán es el primer productor a nivel nacional contribuyendo con el 62.6% de la fresa (SIAP 2024).

El cultivo de la fresa es afectado continuamente por una gran cantidad de plagas y enfermedades durante el desarrollo de la planta, siendo los hongos una de las principales causas que la afectan, pero es en postcosecha donde hongos como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Rhizopus stolonifer* afectan su comercialización (Elmer y Michailides, 2007, Garay-Serrano et al., 2021). Estos patógenos afectan distintas partes de la planta, entre ellos a los botones florales, y su manifestación es recurrente luego de la cosecha (Smith, 2008; Petraschet et al., 2019), representando famosos patógenos postcosecha por las pérdidas económicas que llegan a ocasionar pudiendo afectar, en el caso de *Colletotrichum*, hasta el 50% del rendimiento (Howard et al., 1992).

Durante varios años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar a los patógenos del cultivo de fresa, sin embargo, con el auge de los cultivos orgánicos, cada vez se hace indispensable, detectar y explorar organismos o sus metabolitos que puedan coadyuvar a su uso en el desarrollo de potenciales paquetes biotecnológicos como alternativas naturales para el control de fitopatógenos (Hernández et al., 2006). Por lo que se planteó evaluar en condiciones *in vitro*, el efecto antagonico de bacterias aisladas principalmente de fresa contra dos hongos fitopatógenos de este cultivo, además de identificar las bacterias a través de análisis filogenéticos de secuencias de la región 16S del ARN ribosomal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de hongos patógenos

Las cepas fúngicas se obtuvieron desde frutos maduros de fresa con síntomas de antracnosis y moho gris. Los frutos infectados fueron incubados en cámara húmeda para inducir la esporulación. Una vez crecidas las hifas, los hongos se aislaron en medio de papa dextrosa agar (PDA), y sembraron por punta de hifa para obtener los cultivos puros. La identificación de los hongos se realizó tras caracterizar la textura y color de la colonia además de la observación de esporas y conidióforos de los aislados.

Strawberry production is considered one of the most important activities within the national agricultural production and Mexico, in 2023, ranked fifth in world production, totaling 641,552 tons and exporting 57% of the fruit. The state of Michoacan is the first producer at national level contributing 62.6% of strawberries (SIAP 2024).

The strawberry crop is continuously affected by many pests and diseases during plant development, being fungi one of the main causes that affect it, but it is in postharvest where fungi such as *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* and *Rhizopus stolonifer* affect its commercialization (Elmer and Michailides, 2007, Garay-Serrano et al., 2021). These pathogens affect different parts of the plant, including flower buds, and their manifestation is recurrent after harvest (Smith, 2008; Petraschet et al., 2019), representing famous post-harvest pathogens because of the economic losses they can cause, affecting, in the case of *Colletotrichum*, up to 50% of the yield (Howard et al., 1992).

For several years, synthetic fungicides have been used to control strawberry pathogens; however, with the rise of organic crops, it is becoming increasingly indispensable to detect and explore organisms or their metabolites that can contribute to the use of microorganisms in the development of potential biotechnological packages as natural alternatives for the control of phytopathogens (Hernández et al., 2006). Therefore, it was proposed to evaluate under *in vitro* conditions, the antagonistic effect of bacteria isolated mainly from strawberry against two phytopathogenic fungi of this crop, in addition to identifying the bacteria through phylogenetic analysis of sequences of the 16S ribosomal RNA region.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of pathogenic fungi

Fungal strains were obtained from mature strawberry fruits with symptoms of anthracnose and gray mold. Infected fruits were incubated in a humid chamber to induce sporulation. Once the hyphae developed, the fungi were isolated on potato dextrose agar (PDA) medium and purified by hyphal tip technique. The identification of the fungi was made after characterizing the texture and color of the colony in addition to the observation of spores and conidiophores of the isolates.

Bacteria used in the assays

Four bacterial isolates (Bact1, 8, 153 and 167) were reactivated from the collection of the laboratory of beneficial and pathogenic microorganisms of the Centro Regional del Bajío. Bacteria with the codes Bact1, Bact8 and Bact167 were isolated from strawberry plants or fruits, while Bact153 was obtained from blueberry rhizosphere (Table 1).

Bacteria Bact1 and Bact8 were selected in a previous study (Cruz-Palacios, 2019) they induced the

Bacterias usadas en los ensayos

Se reactivaron cuatro aislados bacterianos (Bact1, 8, 153 y 167) de la colección del laboratorio de microorganismos benéficos y patogénicos del Centro Regional del Bajío. Las bacterias con los códigos Bact1, Bact8 y Bact167 fueron aisladas de la planta o frutos de fresa, mientras que la Bact153 se obtuvo de la rizósfera de arándano (Tabla 1).

Las bacterias Bact1 y Bact8 se eligieron ya que en un estudio anterior (Cruz-Palacios, 2019) indujeron la disminución del crecimiento micelial de hongos como *Rhizoctonia*, *Nigrospora* y *Epicoccum* mientras que la muestra proveniente de arándano ha mostrado antagonismo contra los fitopatógenos *Neopestalotiopsis* y *Lasiodiplodia* (Garay-Serrano et al., *en proceso de publicación*). La Bact167 es una bacteria obtenida en este trabajo y su actividad antagonista no había sido evaluada previamente.

decrease of mycelial growth of fungi such as *Rhizoctonia*, *Nigrospora* and *Epicoccum* while the sample from blueberry has shown antagonism against the phytopathogens *Neopestalotiopsis* and *Lasiodiplodia* (Garay-Serrano et al., *in publication process*). Bact167 is a bacterium obtained in this work and its antagonistic activity has not been previously evaluated.

Characterization and molecular identification of bacterial colonies

The strains were initially characterized with the Gram staining that differentiates Gram-negative and Gram-positive bacteria. The technique consisted of mixing a bacterial sample on a slide with 20 µl of sterile physiological saline solution, once the sample was dry, it was heat fixed by passing the preparation 4 times through the flame of the burner. Crystal violet was added for 60 seconds, rinsed with

Tabla 1. Localidad y datos de procedencia de los aislados bacterianos usados en este estudio.

Table 1. Location and provenance data of the bacterial isolates used in this study.

Código de la bacteria	Origen	Lugar de colecta	Fecha de colecta
Bact1	Hoja de fresa	Tiripetío, Michoacán, México	29/04/2019
Bact8	Fruto de fresa	Tiripetío, Michoacán, México	08/05/2019
Bact153	Rizósfera de arándano	Cherán, Michoacán, México	06/09/2019
Bact167	Fruto de fresa	Mercado de Pátzcuaro, Michoacán, México	15/11/2022

Caracterización e identificación molecular de las colonias bacterianas.

Las cepas inicialmente fueron caracterizadas con la de tinción de Gram que diferencia a las bacterias Gram negativas y las Gram positivas. La técnica consistió en mezclar una muestra bacteriana en un portaobjetos con 20 µl de solución salina fisiológica estéril, una vez seca la muestra, se fijó con calor pasando la preparación 4 veces por la llama del mechero. Se adicionó cristal violeta durante 60 segundos, se enjuagó con agua destilada. Posteriormente se agregó una gota de yodo y tras 60 segundos, se enjuagó con agua destilada. Después se decoloró con alcohol por 10 segundos y se enjuagó con agua destilada. Por último, se adicionó safranina durante 20 segundos, y tras enjuagar con agua destilada y se dejó secar. La preparación se observó al microscopio óptico con el objetivo 100x y con aceite de inmersión. Las bacterias Gram (+) se tiñeron de morado, mientras que las Gram (-) mostraron tinción rosa.

La identificación molecular de las bacterias se realizó mediante secuenciación de la región 16S del ARNr, para lo cual se extrajo el ADN de cada aislado utilizando kit

distilled water. Later, a drop of iodine was added and left to act for 60 seconds, it was rinsed with distilled water. Then it is decolorized with alcohol for 10 seconds and rinsed with distilled water. Finally, safranin is added for 20 seconds, rinsed with distilled water and allowed to dry. The preparation was observed under an optical microscope with a 100x objective and immersion oil. Bacteria Gram (+) stained purple, while Gram (-) stained pink.

Molecular identification of the bacteria was performed by sequencing the 16S region of rRNA, for which DNA was extracted from each isolate using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), according to the manufacturer's protocol for the isolation of genomic DNA from Gram-negative and Gram-positive bacteria. The 16S region of the rRNA was amplified using primers 27F (5'-AGA GTT TGA TGA TCM TGG CTC AG-3') and 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') (Lane, 1991). The 25 µL PCR reaction mixture was prepared with 2.5 µl of 5X GoTaq Flexi buffer (Promega), 2.5 µL of MgCl₂ (25 mM), 1 µL of dNTPs (10 mM), 1 µL of each 10 µM primer (27F and 1492R), 0.1 µL of 1% bovine serum albumin (BSA), 0.20 µL of Go Taq (5 U/µL) and 2.5 µL of DNA. For the

Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), según el protocolo del fabricante para el aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram negativas y positivas. La región 16S del ARNr se amplificó utilizando los iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') (Lane, 1991). La mezcla de reacción de la PCR de 25 µl se preparó con 2.5 µl de buffer 5X GoTaq Flexi (Promega), 2.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada primer 10 µM (27F y 1492R), 0.1 µl de albúmina sérica bovina al 1% (BSA), 0.20 µl de Go Taq (5 U/µL) y 2.5 µl de ADN. Para el programa de amplificación se siguió el descrito en Guevara-Avenidaño et al. (2018). La amplificación de los productos de PCR se verificó en gel de agarosa al 1.0% con una mezcla de 3 µl de producto de PCR y 2 µl de azul de bromofenol/Gel Red Nucleic Acid gel stain. Los amplicones se enviaron a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) para su purificación y secuenciación. Las secuencias, una vez editadas y ensambladas en BioEdit 7.2.5, fueron comparadas con las de la plataforma EZBioCloud, que contiene secuencias de especies válidas de procariontes. Las secuencias con porcentajes de similitud más altos de cada taxón bacteriano de este estudio fueron descargadas y se conjuntaron en una matriz para cada género bacteriano. La matriz se alineó utilizando el programa Mafft (Katoh et al., 2019). Posteriormente se determinó el modelo evolutivo que mejor se ajusta a cada conjunto de datos utilizando jModel test v.0.1.1 (Posada, 2008). Los análisis de inferencia filogenética se realizaron por el método de Máxima Verosimilitud (MV) con 1000 réplicas de bootstrap en el programa MEGA versión 11.0.10. (Tamura et al., 2021), y por inferencia bayesiana (IB) utilizando el programa MrBayes 3.2.7a (Ronquist et al., 2012) para 1,000,000 de réplicas. Las filogenias de los análisis de MV e IB se visualizaron en Mega 6.06 o FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016) respectivamente. Las secuencias bacterianas obtenidas en este trabajo se depositaron en la base de datos del NCBI.

Ensayos de confrontación de bacterias contra hongos fitopatógenos

La capacidad antagonista *in vitro* de las cepas de bacterias contra *B. cinerea* y *Colletotrichum* sp. se determinó a través de ensayo de confrontación dual en placas de Petri de 9cm de diámetro. En el centro de la caja se colocó un círculo de micelio de 5 mm del hongo a confrontar y a 2 cm de distancia en línea recta y en cada lado del hongo, se situó un punto de muestra bacteriana (Fig. 1). La misma combinación hongo/bacteria se realizó por triplicado, para cada una de las bacterias y los hongos. Se repitió todo el ensayo una segunda vez. El tratamiento de control para las especies patogénicas también se estableció por triplicado colocando el círculo de micelio sin presencia de bacterias. Después de siete días de incubación a 25°C, se midió el radio de crecimiento del micelio del patógeno tanto en el control como en cada confrontación. Se calculó el porcentaje de in-

amplificación program, the one described in Guevara-Avenidaño et al. (2018) was followed. The amplification of PCR products was verified in 1.0% agarose gel and a mixture of 3 µL of PCR product and 2 µL of bromophenol blue/Gel Red Nucleic Acid gel stain. The amplicons were sent to Macrogen Inc. (Seoul, Korea) for purification and sequencing. The sequences, once edited and assembled in BioEdit 7.2.5, were compared in the EZBioCloud platform, which contains sequences of valid prokaryote species. The sequences with highest similarity percentages for each bacterial taxon in this study were downloaded and assembled into a matrix for each bacterial genus. The matrix was aligned using the Mafft program (Katoh et al., 2019). Subsequently, the best-fitting evolutionary model for each dataset was determined using jModel test v.0.1.1 (Posada, 2008). Phylogenetic inference analyses were performed by the Maximum Likelihood (ML) method with 1000 bootstrap replicates in the program MEGA version 11.0.10. (Tamura et al., 2021), and by Bayesian inference (BI) using the program MrBayes 3.2.7a (Ronquist et al., 2012) for 1,000,000 replicates. Phylogenies from ML and BI analyses were visualized in Mega 6.06 or FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2016) respectively. Bacterial sequences obtained in this work were deposited in the NCBI database.

Confrontation assays of bacteria against phytopathogenic fungi

The *in vitro* antagonistic capacity of the bacterial strains against *B. cinerea* and *Colletotrichum* sp. was determined by means of a dual confrontation assay in Petri dishes of 9 cm in diameter. A 5 mm circle of mycelium of the fungus to be confronted was placed in the center of the box and a bacterial sample spot was placed 2 cm away in a straight line on each side of the fungus (Fig 1). The same fungus/bacteria combination was performed in triplicate, for each of the bacteria and fungi. The entire assay was repeated a second time. The control treatment for the pathogenic species was also set up in triplicate by placing the mycelium circle without the presence of bacteria. After seven days of incubation at 25°C, the mycelial growth radius of the pathogen mycelium was measured in both the control and each confrontation. The percentage inhibition was calculated with the formula $PICR = (R1 - R2) / R1 * 100$ where R1 is the average radius of pathogen growth in the control box and R2 is the average value of the radius of pathogen growth in the confrontation box with the bacteria (Ezziyany *et al.*, 2004).

Statistical analysis

The results of percentages of mycelial growth inhibition of phytopathogenic fungi by bacteria were analyzed with the SigmaStat v3.5 program, verified the assumptions of normality and homoscedasticity of the data, and then a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Means were compared with tukey's test ($\alpha=0.05$)

hibición con la fórmula $PICR = (R1 - R2) / R1 * 100$ donde R1 es promedio del radio del crecimiento del patógeno en caja control y R2 es el valor promedio del radio del crecimiento del patógeno en la caja de enfrentamiento con la bacteria (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Análisis estadísticos

Los resultados de porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos por las bacterias fueron analizados con el programa SigmaStat v3.5, comprobándose los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), considerándose significativos para $p \leq 0.05$.

being considered significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of fungi

The phytopathogens were isolated from a strawberry fruit where both fungi were found causing disease (Fig. 2A). The gray mold produced by *B. cinerea* was characterized by a grayish mycelium, with sparse hyphae, causing fruit rot, while the anthracnose symptom was observed covering a surface with broad, dark-colored, slightly dry spots, and after one day in a humid chamber, compact whitish mycelium was observed. The isolates (Fig. 2B-C) were labeled as INE196 (*Botrytis cinerea*) and INE199 (*Colletotrichum* sp.).

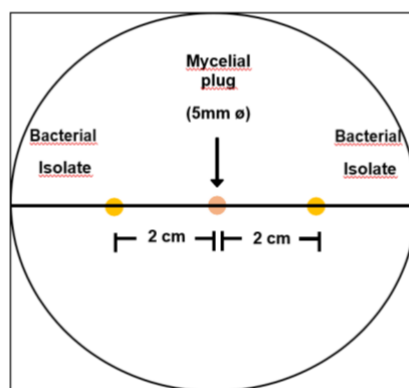


Figura 1. Diseño de confrontación fúngica de cada hongo fitopatógeno (centro) contra un aislado bacteriano.

Figure 1. Fungal confrontation design of each phytopathogenic fungus (center) against a bacterial isolate.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de hongos

Los fitopatógenos fueron aislados de un fruto de fresa donde ambos hongos se encontraron causando enfermedad (Fig. 2A). El moho gris producido por *B. cinerea* se caracterizó por un micelio grisáceo, con hifas escasas, causando pudrición del fruto, mientras que el síntoma de antracnosis se observó cubriendo una superficie con manchas amplias de color oscuro y ligeramente secas, luego de un día en cámara húmeda, se observó micelio blanquecino compacto. Los aislados (Fig. 2B-C) fueron rotulados como INE196 (*Botrytis cinerea*) e INE199 (*Colletotrichum* sp.).

La observación de estructuras microscópicas apoyó la determinación de los hongos. En el caso de *B. cinerea* los conidióforos fueron largos, hialinos, con hifas gruesas, ramificadas hacia el ápice, las esporas de forma amigdaliformes, café-hialinas (Fig. 2D). *Colletotrichum* sp. formó conidiomas en el medio de cultivo y, al microscopio,

The observation of microscopic structures supported the determination of the fungi. In the case of *B. cinerea* the conidiophores were long, brown, with thick hyphae, branched towards the apex, the spores were amygdaliform, hyaline-brown (Fig. 2D). *Colletotrichum* sp. formed conidiomata on the culture medium and, under the microscope, short conidiophores with hyaline and subcylindrical conidia (Fig. 2E).

Molecular identification of bacteria

Sequences of the 16S rRNA gene were obtained from the four bacteria, fragment sizes ranged from 1352 to 1428 bp. When comparing the information in EzBioCloud, Bact1 was most similar to *Bacillus siamensis*, belonging to the “*subtilis*” species complex. Bact8 and Bact153 were determined at genus level (*Streptomyces* and *Paenibacillus*, respectively) and Bact167 at species level as *Gluconobacter cerinus*. The taxa with the highest similarity and coverage with respect to those of this study are shown in detail in Table 2. The sequences obtained were deposited in the NCBI data-

conidióforos cortos con conidios hialinos y subcilíndricos (Fig. 2E).

base with accession numbers PQ571720-PQ571722 and OK263114.

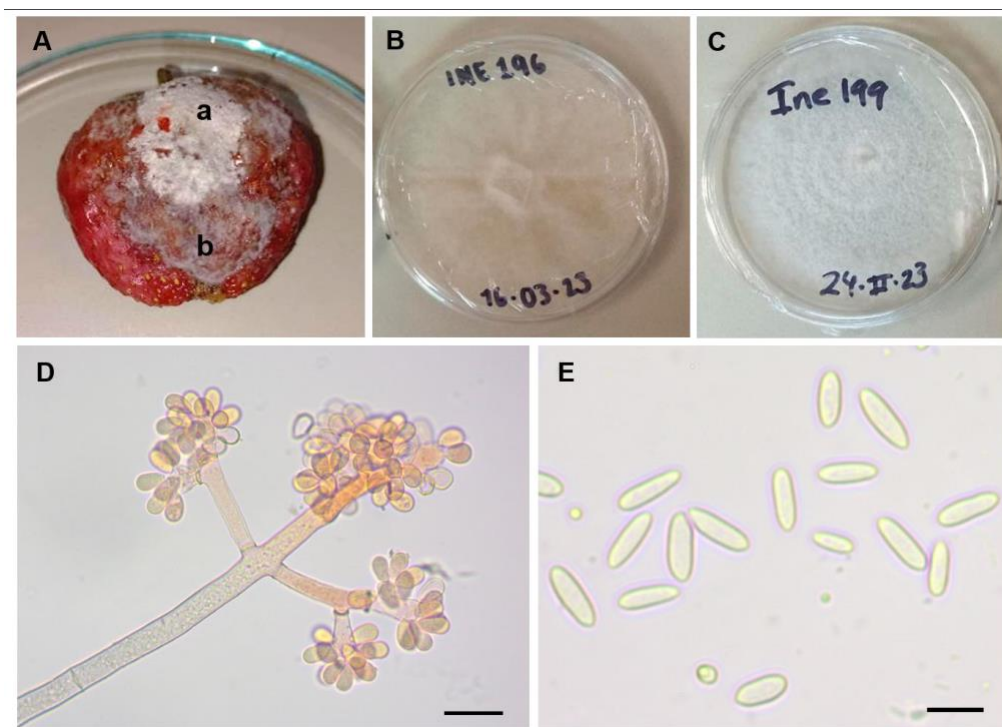


Figura 2. Hongos fitopatogénos que afectan a la fresa. A) Fruto infectado por micelio de *Colletotrichum* sp. (a) y por *B. cinerea* (b). B) Aislado de *B. cinerea*, C) Aislado de *Colletotrichum* sp. en medio PDA, D) conidióforo y conidios de *B. cinerea* teñidos con rojo Congo, E) esporas hialinas de *Colletotrichum* sp. Escala: 30 μ m (D), 10 μ m (E).

Figure 2. Phytopathogenic fungi affecting strawberry. A) Fruit infected by mycelium of *Colletotrichum* sp. (a) and by *B. cinerea* (b). B) Isolate of *B. cinerea*, C) Isolate of *Colletotrichum* sp. on PDA medium, D) conidiophore and conidia of *B. cinerea* stained with Congo red, E) hyaline spores of *Colletotrichum* sp. Scale bars: 30 μ m (D), 10 μ m (E).

Identificación molecular de bacterias

Se obtuvieron secuencias del gen 16S del ARNr de las cuatro bacterias, los tamaños de fragmentos fueron entre 1352 y 1428 pb. Al comparar la información en EzBioCloud, Bact1 tuvo mayor similitud con *Bacillus siamensis*, perteneciente al complejo de especies “*subtilis*”. Bact8 y Bact153 se determinó a género (*Streptomyces* y *Paenibacillus* respectivamente) y Bact167 a nivel de especie como *Gluconobacter cerinus*. Los taxones con mayor similitud y cobertura con respecto a las de este estudio, se observan a detalle en la Tabla 2. Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos del NCBI con números de acceso PQ571720-PQ571722 y OK263114.

Para los análisis filogenéticos se construyeron cuatro matrices, una para cada código bacteriano de este estudio. La conformación de cada matriz, la longitud y el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica que mejor se

For the phylogenetic analyses, four matrices were constructed, one for each bacterial code in this study. The conformation of each matrix, the length and the evolutionary model of nucleotide substitution that best fit the data provided by the JModel test program are detailed in Table 3.

In the phylogenetic analysis, Bact1 clustered in a clade together with other *Bacillus* species of the “*subtilis*” complex: *B. amyloliquefaciens*, *B. velenzensis* and *B. siamensis*, and although in the maximum likelihood (ML) phylogeny Bact1 clusters with *B. siamensis* (Fig. 3), in the Bayes phylogeny, it clusters in a stepwise way with no particular affinity to any of the species of the complex. Bootstrap support in the ML phylogeny is low (43%), so the Bact1 sequence is affine to *B. siamense* and its species definition will require analysis using additional markers.

In the case of Bact8, both, the phylogenetic analysis of ML and Bayesian inference (BI), grouped the sequence in the same clade with three *Streptomyces* species: *S.*

adaptó a los datos obtenido por el programa JModel test, se detallan en la tabla 3.

En el análisis filogenético, Bact1 se agrupó en un clado junto con otras especies de *Bacillus* del complejo “*subtilis*”: *B. amyloliquefaciens*, *B. velenzensis* y *B. siamensis*, y aunque en la filogenia de máxima verosimilitud (MV) Bact1 se agrupa con *B. siamensis* (Fig. 3), en la filogenia de Bayes, se agrupa de manera escalonada sin una afinidad particular a alguna de las especies del complejo. El soporte de bootstrap en la filogenia de MV es bajo (43%), por lo que la secuencia Bact1 es afín a *B. siamense* y cuya definición a especie requerirá de análisis usando marcadores adicionales.

Para el caso de Bact8, tanto el análisis filogenético de MV y de inferencia Bayesiana, agruparon en el mismo clado, la secuencia junto con tres especies de *Streptomyces*: *S. albidoflavus*, *S. daghestanicus* y *S. violascens* (Fig. 4), sin definición específica con alguna de las secuencias. En el clado formado, se mostraron valores dispares de confiabilidad: PB=0.62 y bootstrap=99%, por lo que el análisis sólo con el marcador 16S no fue suficiente para definir la especie.

La filogenia con máxima verosimilitud agrupó a Bact153 con la secuencia E681 que corresponde a *Paenibacillus polymyxa* (Fig. 5), con valor de bootstrap=42%, aunque en IB no se recuperó la agrupación solo con E681, si no que quedaron de manera independiente con clado hermano de *P. peoriae* / *P. kribbensis*, por lo que se requeriría contar con algún marcador adicional para definir la especie de *Paenibacillus* de Bact153.

La secuencia Bact167 sí pudo definirse a nivel específico tanto en el análisis de máxima verosimilitud (Fig. 6) como en el de inferencia bayesiana, ya que Bact167 se agrupó junto con *Gluconobacter cerinus* con alta significancia de PB/bootstrap= 1/100.

Capacidad antagónica de bacterias contra hongos fitopatógenos

Las cuatro bacterias, con excepción de *Streptomyces* sp. contra *B. cinerea* (INE196), fueron capaces de disminuir el crecimiento del micelio de ambos patógenos (Tabla 4, Fig. 7). Las bacterias que mostraron más alta inhibición de *B. cinerea* (INE196) fueron *Bacillus* sp., *G. cerinus* y *Paenibacillus* sp. con porcentajes mayores a 78%, mientras que para *Colletotrichum*, las bacterias *Bacillus* sp., y *Streptomyces* sp., fueron las mejores antagonistas con porcentajes mayores a 80%.

Referente a investigaciones que han evaluado *in vitro* la inhibición de crecimiento del micelio por los géneros de las bacterias estudiadas, se encuentran los de Bouchard-Rochette et al. (2022) y Shternshis et al. (2015) donde con ensayos de confrontación de *Bacillus* de las especies del complejo *subtilis*, obtuvieron resultados similares a los de este trabajo, con muy alta inhibición de *B. cinerea* (> 80% y hasta casi 100%).

albidoflavus, *S. daghestanicus* and *S. violascens* (Fig. 4), and without specific definition with any of the sequences. In the clade formed, mixed reliability values were shown as Bayes posterior probability (BP)=0.62 and bootstrap=99%, therefore the analysis with the 16S marker alone was not sufficient to define the species.

The phylogeny with maximum likelihood, grouped Bact153 with the sequence E681 corresponding to *Paenibacillus polymyxa* (Fig. 5), with bootstrap value= 42%, although in BI the grouping was not recovered only with E681, but they were independently with sister clade of *P. peoriae* / *P. kribbensis*, which would require some additional marker to define the *Paenibacillus* species of Bact153.

The Bact167 sequence could be defined at a specific level in both, the maximum likelihood analysis (Fig. 6) and Bayesian inference analysis, since Bact167 clustered together with *Gluconobacter cerinus* with high significance with BP/bootstrap= 1/100.

Antagonistic capacity of bacteria against phytopathogenic fungi

All four bacteria, except for *Streptomyces* sp. against *B. cinerea* (INE196), were able to decrease mycelial growth of both pathogens (Table 4, Fig. 7). The bacteria that showed the highest inhibition of *B. cinerea* (INE196) were *Bacillus* sp., *G. cerinus* and *Paenibacillus* sp. with percentages higher than 78%, while for *Colletotrichum*, *Bacillus* sp. and *Streptomyces* sp. were the best antagonists with percentages higher than 80%.

Researches that have evaluated *in vitro* mycelial growth inhibition by the bacterial genus here studied, are those of Bouchard-Rochette et al. (2022) and Shternshis et al. (2015), where with *Bacillus* species of the *subtilis* species complex in confrontation assays, they obtained similar results as in this work, with very high inhibition of *B. cinerea* (> 80% and up to almost 100%). For the case of *Colletotrichum*, Es-Soufi et al. (2020) obtained data greater than 99% mycelial inhibition of *C. acutatum* when confronted against *B. amyloliquefaciens*, similar to what we obtained for Bact1 which is from the same complex, however, Wu et al. (2023) with another strain of *B. amyloliquefaciens* against the same pathogen obtained a decrease between 30.0% and 15.6%, those results show the variation that may exist at the intraspecific level.

In the case of *Streptomyces* species, there are reports with high inhibition percentages where *Streptomyces* sp. inhibited mycelial growth in 80% of *C. fragariae* (Li et al., 2021) and of *Colletotrichum* sp. (Evangelista-Martínez, 2014). While for *B. cinerea*, the inhibition reached almost 100% in dual cultures *in vitro* with *Streptomyces philanthi* and *S. mycarofaciens* (Boukaew et al. 2017). Bact8 although it did not obtain such high percentages against *B. cinerea* (4.5%), it is efficient against *Colletotrichum* sp. showing more than 80% inhibition. A low inhibition of *B. cinerea* has been found in *in vitro* assay by *Paenibacillus* sp. action

Tabla 2. Caracterización de las bacterias de este estudio con tinción de Gram y asignación taxonómica al comparar las secuencias de la región 16S del ARNr con las de la base de datos EZBioCloud.

Table 2. Characterization of the bacteria in this study with Gram staining and taxonomic assignment by comparing the sequences of the 16S rRNA region with those in the EZBioCloud database.

ID Bacterial isolate	Taxonomic assignment	Gram staining	Acc. number in GenBank	EZBioCloud identification based on 16S rRNA sequences				
				Top-hit taxon	Top-hit strain	Similarity (%)	Top-hit taxonomy	Completeness (%)
BACT1	<i>Bacillus</i> aff. <i>siamensis</i>	+	PQ571720	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613	99.86	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus	96.3
BACT8	<i>Streptomyces</i> aff. <i>daghestanicus</i>	+	PQ571721	<i>Streptomyces daghestanicus</i>	NRRL B-5418	100.0	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetia; Streptomycetales; Streptomycetaceae; Streptomyces	94.3
BACT153	<i>Paenibacillus</i> aff. <i>polymyxa</i>	+	OK263114	<i>Paenibacillus peoriae</i>	DSM 8320	99.72	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Paenibacillaceae; Paenibacillus	96.6
BACT167	<i>Gluconobacter cerinus</i>	-	PQ571722	<i>Gluconobacter cerinus</i>	NBRC 3267	99.93	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; Gluconobacter	96.2

Para el caso de *Colletotrichum*, Es-Soufi et al. (2020) obtuvieron datos mayores a 99% de inhibición miceliar de *C. acutatum* al confrontar contra *B. amyloliquefaciens*, similar a lo que obtuvimos para la Bact1 que es del mismo complejo, sin embargo, Wu et al. (2023) con otra cepa de *B. amyloliquefaciens* contra el mismo patógeno obtuvieron una disminución entre 30.0% y 15.6%, estos datos muestran la variación que puede existir a nivel intraespecífica.

(Lumínare et al. 2023) being mycelial inhibition from 2 to 10%, although Passera et al. (2017) evaluated that *Botrytis* growth was inhibited in 100% with the bacterium *Paenibacillus pasadenensis*. A high case of inhibition by *Paenibacillus polymyxa*, that decreased the *Colletotrichum scovillei* growth by 69.04% (Tram et al., 2023) and *Paenibacillus alvei* inhibiting *Colletotrichum falcatum* growth up to 50% (Elamathi et al., 2016). In this research, Bact153 obtained even better percentages, reaching 78%.

Tabla 3. Características de las matrices de datos integradas para los análisis filogenéticos de las bacterias estudiadas.

Table 3. Characteristics of the integrated data matrices for phylogenetic analyses of the bacteria studied.

Código de la secuencia	No. de secuencias en la matriz de datos	Longitud de matriz	Mejor modelo evolutivo
Bact1	19	1423 pb	TVM I+G
Bact8	22	1371 pb	TIM2 I+G
Bact153	15	1426 pb	HKY I+G
Bact167	21	1353 pb	F81+I

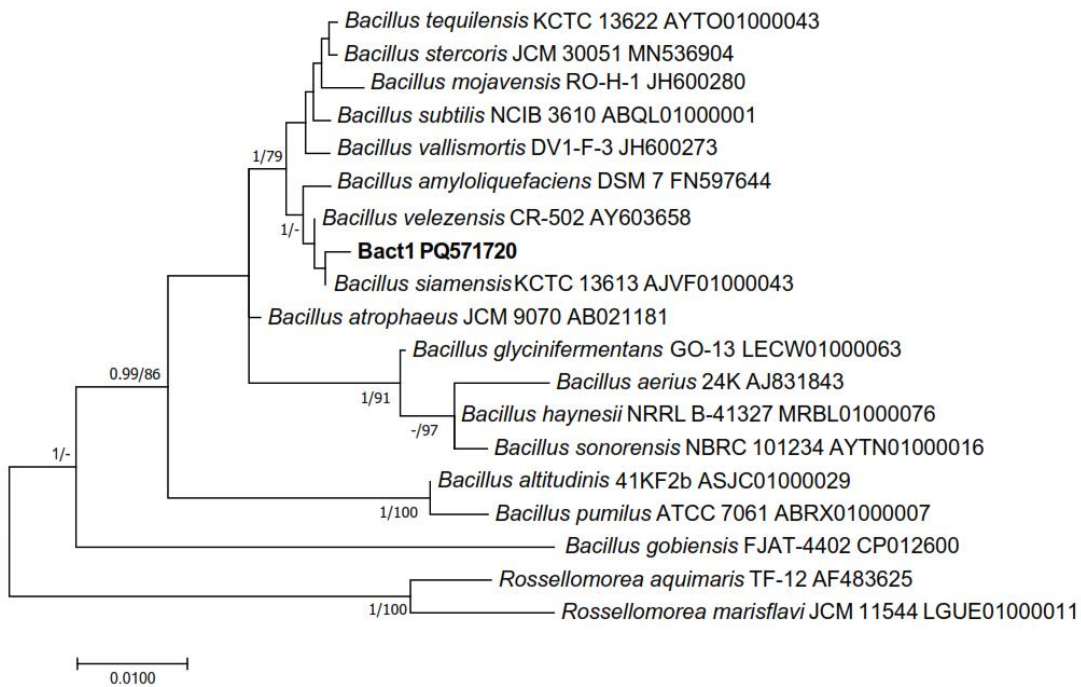


Figura 3. Árbol filogenético de secuencias de 16S ARNr de especies de *Bacillus* relacionadas con Bact1, inferido con máxima verosimilitud. Las probabilidades posteriores bayesianas (> 0.90) y los valores de soporte de bootstrap (> 70%) se indican en los nodos. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. La nueva secuencia de este estudio se destaca en negritas.

Figure 3. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of *Bacillus* species related to Bact1, inferred with maximum likelihood. Bayesian posterior probabilities (> 0.90) and bootstrap support values (> 70%) are indicated at the nodes. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The new sequence from this study is highlighted in bold.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos por las bacterias (Bact1, 8, 153 y 167). El experimento de confrontación dual *in vitro* se realizó dos veces con tres repeticiones por tratamiento. Los datos muestran el porcentaje de inhibición ± desviación estándar.

Table 4. Percentage inhibition of mycelial growth of phytopathogenic fungi by bacteria (Bact1, 8, 153 and 167). The *in vitro* dual confrontation experiment was performed twice with three replicates per treatment. Data show the percentage inhibition ± standard deviation.

Fitopatógeno	<i>Bacillus</i> sp. (Bact1)	<i>Streptomyces</i> sp. (Bact 8)	<i>Paenibacillus</i> sp. (Bact153)	<i>Gluconobacter</i> <i>cerinus</i> (Bact167)
<i>Botrytis cinerea</i> (INE196)	95.5 ±2.5 a	4.5±3.9 c	78.4±5.8 b	79.5±4.7 b
<i>Colletotrichum</i> sp. (INE199)	97.5±0.1 a	82.1±3.2 b	77.6±2.8 b	67.0±5.0 c

Medias con diferencias estadísticamente significativas se representan con distintas letras en la fila (Tukey $p \leq 0.05$). Means with statistically significant differences are represented by different letters in the row (Tukey $p \leq 0.05$).

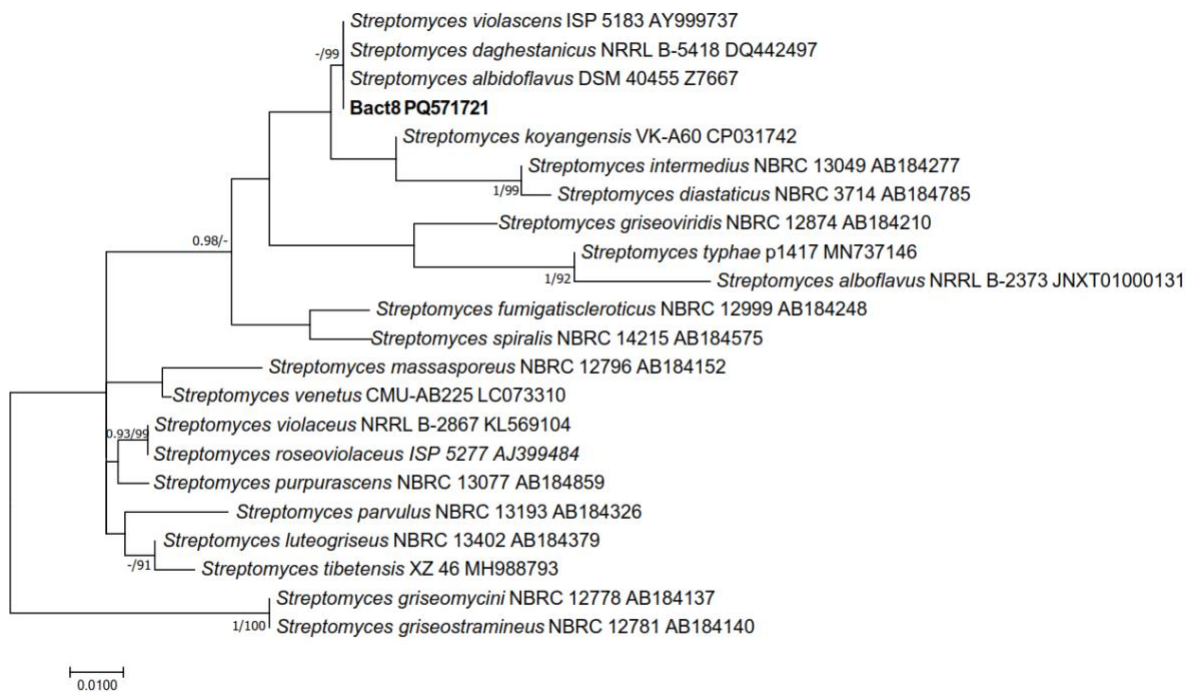


Figura 4. Árbol filogenético de secuencias de 16S ARNr de especies de *Streptomyces* relacionadas con Bact8, inferido con máxima verosimilitud. Las probabilidades posteriores bayesianas (> 0.90) y los valores de soporte de bootstrap (> 70%) se indican en los nodos. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. La nueva secuencia de este estudio se destaca en negritas.

Figure 4. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of *Streptomyces* species related to Bact8, inferred with maximum likelihood. Bayesian posterior probabilities (> 0.90) and bootstrap support values (> 70%) are indicated at the nodes. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The new sequence from this study is highlighted in bold.

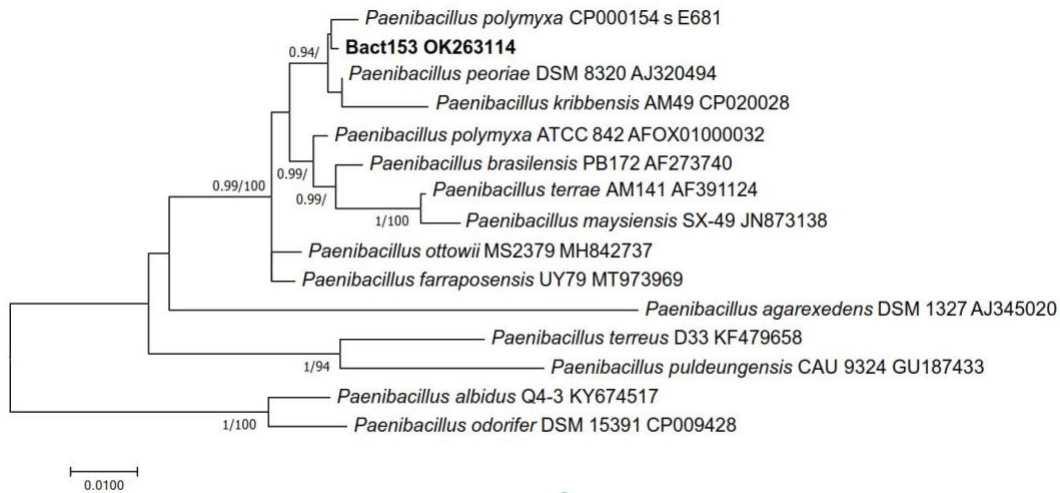


Figura 5. Árbol filogenético de secuencias de 16S ARNr de especies de *Paenibacillus* relacionadas con Bact153, inferido con máxima verosimilitud. Las probabilidades posteriores bayesianas (> 0.90) y los valores de soporte de bootstrap (> 70%) se indican en los nodos. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. La nueva secuencia de este estudio se destaca en negritas.

Figure 5. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of *Paenibacillus* species related to Bact153, inferred with maximum likelihood. Bayesian posterior probabilities (> 0.90) and bootstrap support values (> 70%) are indicated at the nodes. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The new sequence from this study is highlighted in bold.

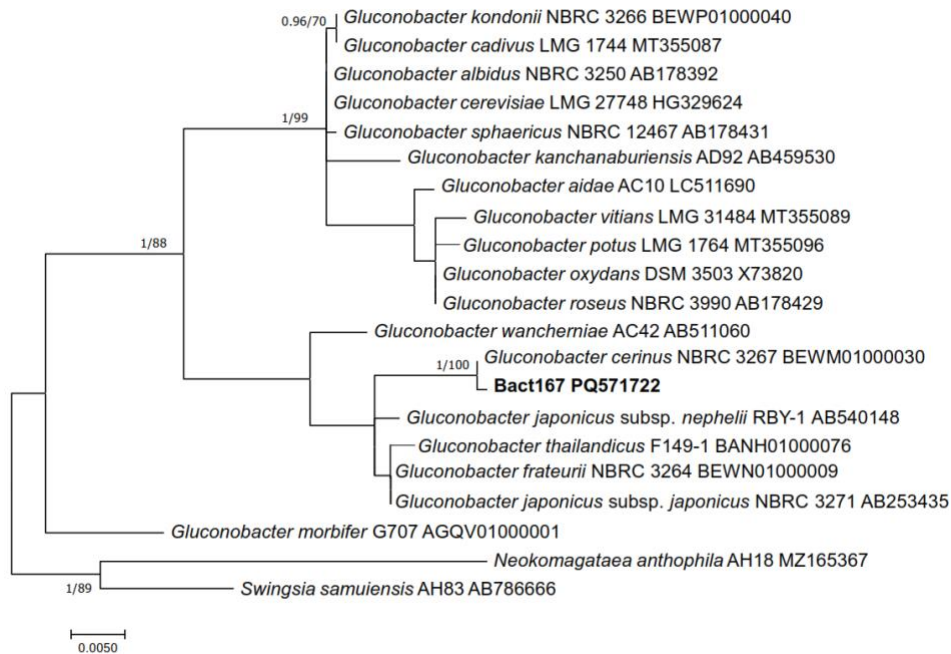


Figura 6. Árbol filogenético de secuencias de 16S ARNr de especies de *Gluconobacter* relacionadas con Bact167, inferido con máxima verosimilitud. Las probabilidades posteriores bayesianas (> 0.90) y los valores de soporte de bootstrap (> 70%) se indican en los nodos. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. La nueva secuencia de este estudio se destaca en negritas.

Figure 6. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequences of *Gluconobacter* species related to Bact167, inferred with maximum likelihood. Bayesian posterior probabilities (> 0.90) and bootstrap support values (> 70%) are indicated at the nodes. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The new sequence from this study is highlighted in bold.

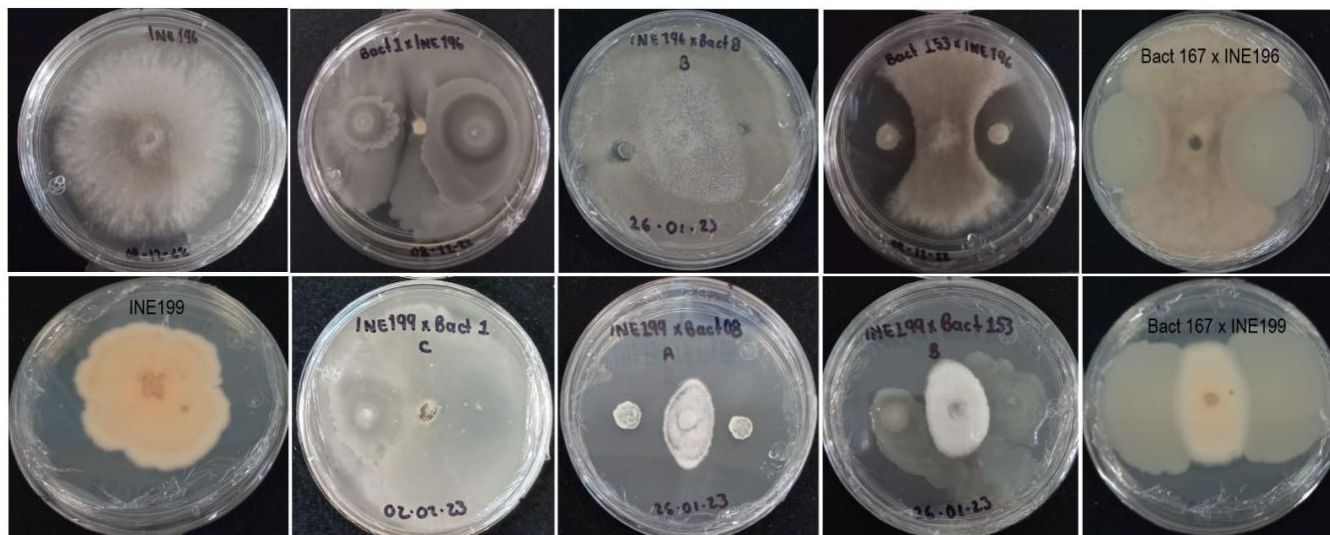


Figura 7. Actividad antifúngica de bacterias contra *B. cinerea* INE196 (imágenes de primera fila) y contra *Colletotrichum* sp. INE199 (imágenes segunda fila). El orden de las imágenes en la fila es: control, confrontaciones vs Bact1, vs Bact8, vs Bact153 y vs Bact167.

Figure 7. Antifungal activity of bacteria against *B. cinerea* INE196 (first row images) and against *Colletotrichum* sp. INE199 (second row images). The order of the images in the row is: control, confrontation vs Bact1, vs Bact8, vs Bact153 and vs Bact167.

Para el caso de especies de *Streptomyces*, existen reportes con altos porcentajes de inhibición donde *Streptomyces* sp. logró inhibir el crecimiento micelial en 80% de *C. fragariae* (Li et al., 2021) y de *Colletotrichum* sp. (Evangelista-Martínez, 2014). Mientras que para *B. cinerea* la inhibición alcanza casi el 100% en cultivos duales *in vitro* con *Streptomyces philanthi* y *S. mycarofaciens* (Boukaew et al., 2017). Bact8, aunque no obtuvo tan altos porcentajes contra *B. cinerea* (4.5%), sí es eficiente contra *Colletotrichum* sp. mostrando más del 80% de inhibición.

Se ha encontrado una baja inhibición de *B. cinerea* en ensayo *in vitro* por acción de *Paenibacillus* sp. (Lumínare et al., 2023) siendo la inhibición micelial de 2 a 10%, aunque Passera et al. (2017) evaluaron que el crecimiento de *Botrytis* fue inhibido en 100% con la bacteria *Paenibacillus pasadenensis*. Un caso alto de inhibición es por *Paenibacillus polymyxa*, que disminuye el crecimiento de *Colletotrichum scovillei* en un 69.04% (Tram et al., 2023) y a *Paenibacillus alvei* inhibiendo el crecimiento de *Colletotrichum falcatum* hasta 50% (Elamathi et al., 2016). En este trabajo Bact153 obtuvo aún mejores porcentajes, alcanzando hasta 78%.

Referente a *Gluconobacter*, pocos trabajos se han realizado evaluando su acción antagónica contra los patógenos de este estudio, sin embargo, Delgado et al. (2021) reportan una disminución de micelio de *B. cinerea* de más de 20% para un ensayo de compuestos difusibles con *G. cerinus*, mientras que la bacteria *Gluconobacter*

Regarding *Gluconobacter*, few works have been carried out as an antagonist of the pathogens in this study, however, Delgado et al. (2021) report a decrease of *B. cinerea* mycelium of just over 20% in a diffusible compounds assay with *G. cerinus*, while the bacterium *Gluconobacter diazotrophicus* showed inhibition of *Colletotrichum falcatum* mycelium between 23 and 33% (Muthukumarasamy et al., 2000). The results of Bact167 led to higher effectiveness by accounting for between 67 and 79% inhibition of *B. cinerea* and *Colletotrichum* sp. respectively.

The aforementioned reflects the variation in the response exhibited by bacteria within the same genus, as shown by Lumínare et al. (2023) for different strains of *Bacillus* where the mycelial inhibition response by *Botrytis* ranged from 8% to 74%, reaffirming the importance of exploring and detecting those bacteria that are widely effective and have potential for biological control.

In this study, the four bacteria studied represent a good set of organisms whose metabolites or by themselves, would support the reduction of phytopathogen damage. Deepening the knowledge of species may offer advantages for better biological control or plant growth promotion since bacterial species are adapted to the environmental conditions of the region (Passera et al. 2017).

diazotrophicus mostró inhibición del micelio de *Colletotrichum falcatum* entre 23 y 33% (Muthukumarasamy et al., 2000). Los resultados de Bact167 condujeron a una mayor efectividad al contabilizar entre 67 y 79% de inhibición de *B. cinerea* y *Colletotrichum* sp. respectivamente.

Lo anterior refleja la variación en la respuesta que exhiben las bacterias dentro de un mismo género, como la mostrada por Lumínare et al. (2023) para distintas cepas de *Bacillus* donde la respuesta de inhibición miceliar por parte de *Botrytis* varió desde un 8% hasta 74%, reafirmando la importancia de explorar y detectar aquellas bacterias ampliamente efectivas y con potencial de control biológico.

En este estudio, las cuatro bacterias estudiadas representan un buen conjunto de organismos cuyos metabolitos o por sí mismos, apoyarían la disminución de la afectación por fitopatógenos. Profundizar en el conocimiento de especies puede ofrecer ventajas para un mejor control biológico o promoción de crecimiento vegetal ya que las especies bacterianas están adaptadas a las condiciones ambientales de la región (Passera et al., 2017).

CONCLUSIONES

Este trabajo aporta información de bacterias con alto potencial de biocontrol: *Bacillus* aff. *siamensis*, *Gluconobacter cerinus* y *Paenibacillus* aff. *polymyxa*. que inhibieron el crecimiento del moho gris de la fresa entre 78-95%, mientras que todas, incluyendo *Streptomyces* aff. *daghestanicus* limitaron el micelio de *Colletotrichum* sp. entre 67 y 97%.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a Rogelio Castañeda-Godoy y Christian Rodríguez-Enríquez del Instituto de Desarrollo Koppert y a Rigoberto Espino Herrera, del Instituto Tecnológico Superior P'urhepecha, por las facilidades para coleccionar las muestras en las parcelas. Se aprecia el apoyo de José Manuel Cruz Palacios, Yanet Jurado Ramírez por el aislamiento de varias bacterias y de Mayra Castro Morales por el apoyo fotografiando las esporas de *Colletotrichum*. Agradecemos a los revisores por las observaciones realizadas para mejorar el manuscrito.

REFERENCIAS

Abad ZG, Burgess T, Bienapfl JC, Redford AJ, Coffey M, Knight L. 2019. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP, Centre for *Phytophthora* Science and Management, and World *Phytophthora* Collection. <https://idtools.org/id/phytophthora/index.php>

CONCLUSIONS

This research provides information on bacteria with high biocontrol potential: *Bacillus* aff. *siamensis*, *Gluconobacter cerinus* y *Paenibacillus* aff. *polymyxa*. that inhibited strawberry gray mold growth between 78-95%, while all of them, including *Streptomyces* aff. *Daghestanicus*, limiting the mycelium of *Colletotrichum* sp. by 67 and 97%.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Rogelio Castañeda-Godoy and Christian Rodríguez-Enríquez of the Koppert Development Institute and Rigoberto Espino Herrera, of the Instituto Tecnológico Superior P'urhepecha, for their help in collecting the samples in the plots. We also thank José Manuel Cruz Palacios, Yanet Jurado Ramírez for the isolation of several bacteria and Mayra Castro Morales for her support in photographing *Colletotrichum* spores. We acknowledge the reviewers for their comments to improve the manuscript.

-
- Bouchard-Rochette, M., Machrafi, Y., Cossus, L., Nguyen, T. T. A., Antoun, H., Droit, A., & Tweddell, R. J. (2022). *Bacillus pumilus* PTB180 and *Bacillus subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 170, 104925. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104925>
- Boukaew, S., Prasertsan, P., Troulet, C., & Bardin, M. (2017). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* by using *Streptomyces* spp. *BioControl*, 62, 793-803. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9825-9>
- Cruz-Palacios. 2019. Informe de estancia: Trabajo de campo y laboratorio para la investigación de organismos antagónicos de hongos fitopatógenos en fresa. Universidad Tecnológica del Oriente de Michoacán.
- Delgado, N., Olivera, M., Cádiz, F., Bravo, G., Montenegro, I., Madrid, A., ... & Besoain, X. (2021). Volatile organic compounds (VOCs) produced by *Gluconobacter cerinus* and *Hanseniaspora osmophila* displaying control effect against table grape-rot pathogens. *Antibiotics*, 10(6), 663. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060663>

- Dobrzyński, J., & Naziębło, A. (2024). *Paenibacillus* as a Biocontrol Agent for Fungal Phytopathogens: Is *P. polymyxa* the Only One Worth Attention?. *Microbial Ecology*, 87(1), 134. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02450-8>
- Elamathi, E., Malathi, P., Viswanathan, R., & Sundar, A. R. 2016. Potential of *Paenibacillus* and *Trichoderma* isolates against *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease in sugarcane. *Journal of Sugarcane Research*, 6 (2), 100-111.
- Elmer, P. A., & Michailides, T. J. (2007). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops. In *Botrytis: biology, pathology and control* (pp. 243-272). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-2626-3.pdf#page=255>
- Es-Soufi, R., Tahiri, H., Azaroual, L., El Oualkadi, A., Martin, P., Badoc, A., & Lamarti, A. 2020. *In Vitro* Antagonistic Activity of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens* against *Colletotrichum acutatum*. *Advances in Microbiology*, 10(3), 82-94. <https://doi.org/10.4236/aim.2020.103008>
- Evangelista-Martínez, Z. 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 1639-1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>
- Garay-Serrano, E., Cruz-Esteban, S., Fernández-Pavia, S. P. F., Rodríguez-Alvarado, G. A., & Gómez-Dorantes, N. (2021). Pathogenic microorganisms infecting berries in Mexico. *International Journal of Agriculture y Biology*, 25(5), 1007-1015. DOI: 10.17957/IJAB/15.1758
- Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., & Battino, M. (2014). Strawberry and human health: Effects beyond antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(18), 3867-3876. <https://doi.org/10.1021/jf405455n>
- Guevara-Avenidaño, E., Carrillo, J. D., Ndinga-Muniania, C., Moreno, K., Méndez-Bravo, A., Guerrero-Analco, J. A., Eskalen A., and Reverchon, F. (2018). Antifungal activity of avocado rhizobacteria against *Fusarium euwallaceae* and *Graphium* spp., associated with *Euwallacea* spp. nr. *formicatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111, 563-572. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M.J. y Gavara, R. 2006. Effect of calcium dips and chitosan coating on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology*. 39:247-253. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.006>
- Howard, C.M., Maas, J.L., Chandler, C.K. and Albregts, E.E. (1992) Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease*, 76, 976-981.
- Katoh, K., J. Rozewicki and K. D. Yamada. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics* 20(4): 1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. pp. 115-175.
- Lee, B. Y., Chen, P. L., & Chen, C. Y. (2024). Suppression of strawberry anthracnose by *Paenibacillus polymyxa* TP3 in situ and from a distance. *Plant Disease*, 108(3), 700-710. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-23-1499-RE>
- Li, X., Jing, T., Zhou, D., Zhang, M., Qi, D., Zang, X., ... & Xie, J. 2021. Biocontrol efficacy and possible mechanism of *Streptomyces* sp. H4 against postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 175, 111401. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111401>
- Ezziyyani, M.; Pérez-Sánchez, C.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Candela, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*. 26:69-78
- Lumînare, M. C., Boiu-Sicuia, O. A., Cojanu, D. N., Buturugă-Barbu, L. D. N., & Cristea, S. (2023). *In vitro* antagonist activity of *Bacillus* spp. strains against *Botrytis cinerea* in strawberry crop. *Romanian Journal for Plant Protection*, 16, 61-65.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Vadivelu, M., 2000. Antagonistic potential of N2 fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went, a causal organism of red-rot of sugarcane. *Current Science*, 78, 1063e1065. <https://www.jstor.org/stable/24103614>
- Passera, A., Venturini, G., Battelli, G., Casati, P., Penaca, F., Quaglino, F., & Bianco, P. A. (2017). Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. *Microbiological Research*, 198, 16-26. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.001>
- Petrasch, S., Knapp, S. J., Van Kan, J. A., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*, 20(6), 877-892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Rambaut, A. 2016. FigTree v1.4.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, A. Suchard and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian

- phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61 (3): 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- SIAP. (2024). Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera. Panorama Agroalimentario 2024. *Secretaría de Agricultura de Desarrollo Rural, México*. 208pp. <https://www.gob.mx/siap/es/articulos/panorama-agroalimentario-2018-2024-la-herramienta-basica-de-consulta-estadistica-del-sector-agropecuario-y-pesquero?idiom=es>
- Smith, B. J. (2008). Epidemiology and pathology of strawberry anthracnose: a North American perspective. *HortScience*, 43(1), 69-73. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.1.69>
- Shternshis, M. V., Belyaev, A. A., Shpatova, T. V., & Lelyak, A. A. (2015). Influence of *Bacillus* spp. on strawberry gray-mold causing agent and host plant resistance to disease. *Contemporary Problems of Ecology*, 8, 390-396. <https://doi.org/10.1134/S1995425515030130>
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38 (7): 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tram, T. T. N., Quang, H. T., Vu, N. Q. H., Nguyen, P. T. T., Thi, T. N. M., Phuong, T. T. B., & Thi, P. T. D. 2023. Isolation of bacteria displaying potent antagonistic activity against fungi causes anthracnose disease in chili. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24(9). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240934>
- Wu, Y. M., Chen, X., Wang, F., Hsiao, C. Y., Yang, C. Y., Lin, S. T., ... & Lin, Y. H. 2021. *Bacillus amyloliquefaciens* strains control strawberry anthracnose through antagonistic activity and plant immune response intensification. *Biological Control*, 157, 104592. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104592>