

Inhibición de *Fusarium solani* por bacterias de la filósfera y rizósfera de árboles del bosque mesófilo de montaña

Inhibition of *Fusarium solani* by bacteria from the phyllosphere and rhizosphere of tropical montane cloud forest trees

Frédérique Reverchon^{1*}, Yonatan S. Escudero-Osorio^{2,3}, Jessica Morteo-Zavaleta^{2,4}, Edgar Guevara-Avendaño^{2,5}, Mónica Ramírez-Vázquez²

¹ Instituto de Ecología, A.C., Red de Estudios Moleculares Avanzados, Calle Prol. Lázaro Cárdenas 253, Col. Centro, Pátzcuaro, Michoacán, México

² Instituto de Ecología, A.C., Red de Estudios Moleculares Avanzados, Carretera antigua a Coatepec 351, Col. El Haya, Xalapa, Veracruz, México

³ Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas, Xalapa, Veracruz, México

⁴ Universidad Veracruzana, Facultad de Química Farmacéutica Biológica, Xalapa, Veracruz, México

⁵ Universidad Tecnológica de la Mixteca, Instituto de Agroindustrias, Huajuapán de León, Oaxaca, México

Resumen

El potencial biotecnológico de las bacterias asociadas a árboles silvestres ha sido escasamente investigado. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antifúngica de bacterias aisladas a partir de muestras de filósfera y de rizósfera de cuatro especies de árboles de un bosque mesófilo de montaña, para así ampliar nuestra búsqueda de agentes potenciales de control biológico del hongo fitopatógeno *Fusarium solani*. Se evaluaron 55 aislados bacterianos en ensayos de antagonismo *in vitro* contra *F. solani*; 15 aislados inhibieron de manera significativa el crecimiento micelial del hongo, con porcentajes de inhibición de hasta 33%. A través de la secuenciación del gen bacteriano 16S rADN, estos aislados se identificaron como pertenecientes al filo Actinobacteria y a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. Posteriormente, se seleccionaron tres aislados con porcentajes de inhibición superiores al 25% para estudiar su efecto sobre las hifas de *F. solani* mediante microscopía confocal. Las imágenes obtenidas confirmaron la actividad antifúngica de estos tres aislados

Abstract

The biotechnological potential of forest tree associated bacteria has scarcely been investigated. Our objective was thus to evaluate the antifungal activity of bacteria isolated from the rhizosphere and phyllosphere of four tree species from a tropical montane cloud forest to expand our search for potential biocontrol agents of the ubiquitous fungal pathogen *Fusarium solani*. A total of 55 bacterial isolates were assessed in *in vitro* antagonism assays against *F. solani*; 15 isolates significantly inhibited the fungus mycelial growth, with inhibition percentages ranging from 7 to 33%. These bacterial isolates were identified through sequencing of their 16S rDNA gene as belonging to the Actinobacteria phylum and to genera *Bacillus*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. Subsequently, three bacterial isolates with percentages of inhibition of mycelial growth higher than 25%, were selected to evaluate their effect on *F. solani* hyphae with Confocal Laser Scanning Microscopy. The resulting images confirmed the antifungal activity of the selected isolates, evidencing the irregular thickening of cell wall in hyphae and

bacterianos ya que se observó el engrosamiento diferencial de la pared celular de las hifas, así como intervalos entre septos más cortos. El aislado *Rhodococcus* sp. PsRi3-003, obtenido de la rizósfera de *Persea schiedeana*, es el candidato más promisorio para la realización de pruebas posteriores, dado que presentó la inhibición más fuerte de *F. solani* y la capacidad de producir alteraciones morfológicas en las hifas. Dichas pruebas deberán incluir ensayos de invernadero para confirmar la actividad antifúngica del aislado *Rhodococcus* sp. PsRi3-003 *in planta* y su potencial como agente de control biológico.

Palabras clave: Actividad antifúngica; *Bacillus*; *Pseudomonas*; Rizobacteria; *Rhodococcus*

* **Autor de correspondencia:**
frederique.reverchon@inecol.mx

Introducción

Los microorganismos asociados a las plantas juegan un papel muy importante para el crecimiento, la salud y la productividad de éstas (Berg, 2009). Los microorganismos rizosféricos, que colonizan la zona de interacción entre las raíces de las plantas y el suelo alrededor de ellas, han sido particularmente estudiados debido a su importancia para la adquisición de nutrimentos, la síntesis de fitohormonas y la protección de las plantas contra agentes patógenos (Philippot *et al.*, 2013; Méndez-Bravo *et al.*, 2018). En cambio, los microorganismos asociados a la filósfera, o parte aérea de las plantas, han sido más escasamente estudiados, aunque evidencias recientes sugieren que pueden proteger a su hospedero y limitar la proliferación de patógenos mediante diferentes mecanismos, como la competencia por nutrimentos y por

shorter hyphal segments between septa. Isolate *Rhodococcus* sp. PsRi3-003, obtained from the rhizosphere of *Persea schiedeana*, seems particularly promising as it presented the strongest inhibition of *F. solani* and produced morphological alterations in hyphae. Its effectiveness as a biocontrol agent of *F. solani* should be further evaluated in greenhouse bioassays, to confirm its antagonistic activity *in planta* and assess any other potential plant growth promoting property.

Keywords: Antifungal activity; *Bacillus*; *Pseudomonas*; Rhizobacteria; *Rhodococcus*

Introduction

Plant-associated microorganisms are crucial for plant growth, health and productivity (Berg, 2009). Rhizosphere microorganisms, which inhabit the interface between plant roots and the surrounding soil, are particularly well studied, due to their role in plant nutrient acquisition, phytohormone synthesis and protection against phytopathogens (Philippot *et al.*, 2013; Méndez-Bravo *et al.*, 2018). Microorganisms associated with the phyllosphere, the aerial surface of plants, have been consistently less studied, although recent evidence shows that they can protect their host and limit pathogen proliferation through different mechanisms, such as competition for space and nutrients, antibiosis and induction of systemic resistance in plants (Vorholt, 2012).

The ability of plant-associated microorganisms to produce a wide range of antimicrobial substances has made them promising candidates to be used in biological control strategies aiming at mitigating the impact caused by phytopathogens. Bacteria such as *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. and Actinobacteria have been shown to successfully inhibit the growth of fungal pathogens both *in*

nicho, la producción de antibióticos y la inducción de resistencia sistémica en la planta (Vorholt, 2012).

Los microorganismos asociados a la planta pueden producir un amplio rango de sustancias antimicrobianas, por lo que han sido considerados como candidatos promisorios en la búsqueda de agentes de control biológico que pudieran contribuir a mitigar el impacto causado por fitopatógenos. Estudios previos han mostrado que bacterias como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. y actinobacterias pueden inhibir de manera significativa el crecimiento de patógenos fúngicos, tanto en condiciones *in vitro* como *in planta* (Cawoy *et al.*, 2015; Hunziker *et al.*, 2015; Arfaoui *et al.*, 2018; Guevara-Avendaño *et al.*, 2018). El control biológico constituye una alternativa para disminuir el uso de agroquímicos; por lo tanto, la actividad antifúngica de bacterias asociadas con la rizósfera y la filósfera de plantas provenientes de diversos ecosistemas debería ser explorada, para poder identificar nuevos agentes de control biológico de enfermedades fúngicas.

La mayoría de los estudios enfocados a la búsqueda de agentes microbianos de biocontrol se ha centrado en microorganismos asociados a cultivos de interés agrícola (Cazorla *et al.*, 2007; De Vrieze *et al.*, 2015; Hunziker *et al.*, 2015; Guevara-Avendaño *et al.*, 2019). En consecuencia, existe poca información sobre el potencial de bacterias asociadas a especies forestales como antagonistas de hongos patógenos (Cazorla and Mercado-Blanco, 2016). Estudios recientes de nuestro grupo de investigación reportaron la actividad antifúngica de rizobacterias asociadas a Lauráceas silvestres de un bosque mesófilo de montaña contra *Fusarium solani*, *F. oxysporum* y *F. kuroshium* (Reverchon *et al.*, 2019; Báez-Vallejo *et al.*, 2020), lo que sugiere que estos ecosistemas podrían constituir un reservorio

in vitro and *in planta* (Cawoy *et al.*, 2015; Hunziker *et al.*, 2015; Arfaoui *et al.*, 2018; Guevara-Avendaño *et al.*, 2018). Biocontrol is an environmentally friendly alternative to the use of agrochemicals; the antifungal activity of rhizosphere and phyllosphere bacteria associated with plants from diverse ecosystems should therefore be further explored to identify successful antagonists of fungal diseases.

Most studies aiming at isolating successful microbial biocontrol agents have focused on crop-associated microorganisms (Cazorla *et al.*, 2007; De Vrieze *et al.*, 2015; Hunziker *et al.*, 2015; Guevara-Avendaño *et al.*, 2019). Consequently, there is a scarcity of information regarding the potential of bacteria associated with forest trees to act as fungal antagonists (Cazorla and Mercado-Blanco, 2016). Recent studies from our group reported the antifungal activity of rhizobacteria isolated from Lauraceae species in a tropical montane cloud forest against *Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *F. kuroshium* (Reverchon *et al.*, 2019; Báez-Vallejo *et al.*, 2020), which suggests that this ecosystem may be an important reservoir for biocontrol agents. Tropical montane cloud forests are highly diverse yet threatened ecosystems (Toledo-Aceves *et al.*, 2011) and it is therefore critical to unravel the biotechnological potential of their microbiota. The objective of this study was thus to evaluate the antifungal activity of bacteria isolated from the rhizosphere and phyllosphere of four tropical montane cloud forest species against the fungal pathogen *F. solani*.

Materials and methods

Sampling and isolation of rhizosphere and phyllosphere bacteria

We selected four tree species that are representative of tropical montane cloud forests, namely *Liquidambar styraciflua* L., *Platanus mexicana* Moric., *Persea schiedeana* Nees and *Damburneya salicifolia* (Kunth) Trofimov & Rohwer, within the Santuario del Bosque de Niebla, a protected area located in Xalapa, State

potencial de agentes de biocontrol. Los bosques mesófilos de montaña son ecosistemas sumamente diversos pero amenazados por la deforestación y el cambio de uso de suelo (Toledo-Aceves *et al.*, 2011) y por ello es crítico elucidar el potencial biotecnológico de la microbiota que albergan. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antifúngica de bacterias asociadas con la rizósfera y la filósfera de cuatro especies de árboles típicas del bosque mesófilo de montaña contra el hongo fitopatógeno *F. solani*.

Materiales y métodos

Muestreo y aislamiento de bacterias provenientes de la rizósfera y de la filósfera

Se seleccionaron cuatro especies de árboles representativas del bosque mesófilo de montaña: *Liquidambar styraciflua* L., *Platanus mexicana* Moric., *Persea schiedeana* Nees y *Damburneya salicifolia* (Kunth) Trofimov & Rohwer, dentro del área protegida Santuario Bosque de Niebla, ubicada en Xalapa, Veracruz, México (19°30'37"N - 19°31'06"N; 96°56'05"W - 96°56'27"W). Tres individuos por especie fueron seleccionados para la toma de muestras. Se colectaron cuatro muestras de suelo rizosférico por árbol, siguiendo la metodología descrita en Guevara-Avendaño *et al.* (2018): las muestras fueron tomadas a 50 cm del tronco y 5 - 10 cm de profundidad, donde se encontraron las raíces finas. Adicionalmente, se colectaron cinco hojas por árbol, de diferentes partes del dosel. Las muestras provenientes de un mismo árbol fueron mezcladas, con el fin de obtener una muestra de suelo rizosférico y una muestra de filósfera por árbol.

Las muestras de suelo rizosférico fueron procesadas en el laboratorio siguiendo lo descrito en Guevara-Avendaño *et al.* (2018): se sacudieron las raíces para remover el suelo suelto y se consideró el suelo adherido a las raíces como suelo rizosférico. Se prepararon soluciones a partir de 1 g de suelo rizosférico y 99 ml de agua destilada estéril, y se elaboraron

of Veracruz, Mexico (19°30'37"N - 19°31'06"N; 96°56'05"W - 96°56'27"W). Three individuals per species were selected for sample collection. Four rhizosphere soil samples were taken per tree, as described in Guevara-Avendaño *et al.* (2018): samples were collected 50 cm from the trunk and at a depth of 5 - 10 cm. Furthermore, five asymptomatic leaves per tree were collected from different parts of the canopy. Samples from a same tree were mixed to obtain one rhizosphere sample and one phyllosphere sample per tree.

Rhizosphere soil samples were processed as described in Guevara-Avendaño *et al.* (2018): loose soil was removed from the roots and the remaining soil, strongly adhered to the roots, was recovered as rhizosphere soil. Soil solutions were prepared from 1 g of rhizosphere soil and 99 ml of distilled water, and serial dilutions were prepared from the initial solution. Fifty μl of the 1×10^{-4} dilution were then streaked onto Luria-Bertani agar (LB, Sigma-Aldrich), in triplicate.

Phyllosphere samples were processed as follows: 1 cm diameter disks were cut from each leaf (5 leaves per phyllosphere sample), placed in 5 ml of saline solution (0.9%) and vigorously shaken for 15 min. After shaking, serial dilutions were prepared from the initial solution. Fifty μl of the 1×10^{-1} and 1×10^{-2} dilutions were then streaked onto LB agar, in triplicate.

All plates were incubated at 30 °C for 10 days. Bacterial isolates were taken from the plates as they grew and cultured in LB until pure cultures were obtained. Culture purity was verified with Gram staining. The obtained bacterial isolates were then grouped into morphotypes based on colony and cell morphological criteria such as shape, edge, elevation, surface, texture, color and Gram staining results.

In vitro antagonism assays against Fusarium solani

One bacterial isolate per morphotype

diluciones seriales a partir de la solución de suelo inicial. Posteriormente, se sembraron 50 μl de la dilución 1×10^{-4} en medio Luria-Bertani (LB, Sigma–Aldrich) sólido, por triplicado.

Las muestras de filósfera fueron procesadas de la manera siguiente: se cortó un disco de 1 cm de diámetro a partir de cada hoja colectada (5 hojas por muestra de filósfera) y se colocaron los cinco discos de la muestra en 5 ml de solución salina (0.9%). La solución con los discos de hojas se agitó de manera vigorosa durante 15 min. Posteriormente, se prepararon diluciones seriales a partir de la solución inicial. Se sembraron 50 μl de las diluciones 1×10^{-1} y 1×10^{-2} en medio LB sólido, por triplicado.

Las cajas Petri se incubaron a 30 °C durante 10 días. Las colonias bacterianas que crecieron en el medio fueron resemebradas mediante la técnica de agotamiento por estría conforme aparecían, hasta obtener cultivos puros. La pureza de los cultivos se verificó mediante tinción de Gram. Los aislados bacterianos obtenidos se agruparon en morfotipos, basado en la descripción morfológica de sus colonias y de sus células (forma, borde, elevación, color, superficie, textura y resultados de la tinción de Gram).

Pruebas de antagonismo in vitro contra Fusarium solani

Se seleccionó de manera aleatoria un aislado por morfotipo, para evaluar su actividad antifúngica contra *F. solani* en ensayos de antagonismo *in vitro*. Los aislados bacterianos seleccionados para las pruebas se resemebraron 24 h antes de implementar los ensayos en medio LB, a 30 °C. La cepa de *F. solani* utilizada en este estudio y en nuestros estudios previos (Guevara-Avenidaño *et al.*, 2019; Reverchon *et al.*, 2019) fue aislada de una planta de Chile (*Capsicum annum* L.) por el Dr. Mauricio Luna-Rodríguez (Universidad Veracruzana, México). Esta cepa se resemebró siete días antes de implementar los ensayos de antagonismo en medio Papa Dextrosa Agar (PDA, Sigma-Aldrich) e incubada a 28 °C.

was randomly selected in order to be tested against *F. solani* in *in vitro* antagonism assays. Twenty-four hours prior to setting up the assays, the selected bacterial isolates were re-streaked onto LB and incubated at 30 °C. The strain of *F. solani* was obtained from chili (*Capsicum annum* L.) by Dr. Mauricio Luna-Rodríguez (Universidad Veracruzana, Mexico), and has been used as a model organism in our previous studies (Guevara-Avenidaño *et al.*, 2019; Reverchon *et al.*, 2019). This fungal strain was cultured on potato dextrose agar (PDA, Sigma–Aldrich), 7 days before implementing the antagonism assays, and incubated at 28 °C.

Antagonism assays were carried out as described in Reverchon *et al.* (2019). Briefly, a mycelial disk of 5 mm of diameter was placed on the center of a PDA Petri plate whilst the bacterial isolate was streaked on two opposite sides of the fungal disk, at a distance of 2 cm. Each selected bacterial isolate was assessed in duplicate. The assays were incubated at 30 °C for 7 days.

After 7 days, mycelium radial growth was measured to calculate inhibition percentages of mycelial growth. For each treatment, mycelial radial growth was measured towards the bacterial treatment (r) and towards the control (R), which corresponded to the maximum growth of the fungus away from the bacteria. Two measurements were taken per plate (for the two bacterial streaks), for a total of four measurements per bacterial treatment. Inhibition percentages of fungal growth by each bacterial isolate were calculated as follows:

$$\% \text{ inhibition} = [(R - r) / R] \times 100.$$

Molecular identification of bacterial isolates with antifungal activity

Molecular identification of bacterial isolates presenting significant inhibition of *F. solani* was carried out through the sequencing of their 16S rRNA gene. DNA was extracted from bacterial isolates using the DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Germany),

Los ensayos de antagonismo se implementaron según lo descrito en Reverchon *et al.* (2019). Se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro en el centro de una caja Petri con medio PDA, y se estrió biomasa del aislado bacteriano a evaluar en dos lados opuestos al hongo, a una distancia de 2 cm. Cada aislado bacteriano se evaluó en duplicado. Los ensayos se incubaron durante siete días a 30 °C.

Después de los siete días, se midió el radio de crecimiento micelial para calcular los porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico por las bacterias evaluadas. Para cada tratamiento, el radio de crecimiento micelial se midió hacia el estriado bacteriano (r) y hacia el control (R), correspondiente al radio de crecimiento máximo del hongo sin la bacteria. Se tomaron dos mediciones por caja Petri (hacia los dos estriados bacterianos), para un total de cuatro mediciones por tratamiento bacteriano. Los porcentajes de inhibición del crecimiento fúngico se calcularon para cada aislado bacteriano con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(R - r) / R] \times 100.$$

Identificación molecular de los aislados bacterianos con actividad antifúngica

Los aislados bacterianos que inhibieron de manera significativa el crecimiento de *F. solani* fueron identificados molecularmente a través de la secuenciación del gen 16S rADN. El ADN de los aislados bacterianos fue extraído con el kit DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Germany), siguiendo las instrucciones del protocolo. La amplificación del gen 16S rADN se llevó a cabo mediante PCR, utilizando el protocolo previamente descrito en Reverchon *et al.* (2019): se prepararon reacciones de 50 µl a partir de cada muestra de ADN extraído, con 25 ng de ADN, 1X de Taq buffer, 0.5 U de Taq polimerasa (Qiagen, Germany), 200 µM de cada nucleótido (dNTP), 1.25 mM de MgCl₂, y 0.4 µM de los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Las reacciones de PCR se llevaron a

following the manufacturer's instructions. Amplification of the 16S rRNA region was implemented through PCR, using the protocol described in Reverchon *et al.* (2019): 50-µl reactions were prepared for each extracted DNA sample with 25 ng of template DNA, 1X of Taq buffer, 0.5 U of Taq DNA polymerase (Qiagen, Germany), 200 µM of each dNTP, 1.25 mM of MgCl₂, and 0.4 µM of primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). PCR was performed in a SureCycler 8800 (Agilent, CA) using the following parameters: initial denaturation step at 95 °C for 4 min; 30 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, annealing at 53 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 2 min; and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were purified using the QiaQuick® Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the kit instructions. Purified PCR products were then sent to MacroGen Inc. for sequencing. Sequences were deposited in GenBank under accession numbers MG550918, MG550919, and MH569190 to MH569200.

Microscopy analysis

Three bacterial isolates with percentages of inhibition of *F. solani* mycelial growth higher than 25% were randomly selected to further assess their effect on *F. solani* hyphae. Mycelium samples (approximately 9 mm²) which were exposed to bacterial isolates were taken in triplicate, and mycelium samples from *F. solani* growing without bacteria were analyzed as a control.

Samples were observed with a Leica Microsystems, Germany) with plan apochromatic 63X (NA 1.4, oil) objective. Images were recorded under transmitted light.

Data analysis

Fungal growth data were analyzed with the SigmaStat v.3.5 software to determine whether bacterial isolates significantly inhibited

cabo en termociclador SureCycler 8800 (Agilent, CA) con los siguientes parámetros: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 4 min; 30 ciclos de 1) desnaturalización a 95 °C por 45 s, 2) anillamiento a 53 °C por 45 s, 3) extensión a 72 °C por 5 min; un ciclo final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron purificados con kit QiaQuick® Purification (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo instrucciones del protocolo. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en Macrogen Inc. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos de GenBank con los números de acceso MG550918, MG550919, y MH569190-MH569200.

Análisis microscópicos

Tres aislados bacterianos con porcentajes de inhibición de *F. solani* superiores al 25% fueron seleccionados aleatoriamente para evaluar su efecto sobre las hifas del hongo. Para la revisión microscópica, se tomaron muestras de aproximadamente 9 mm² de micelio expuesto a los aislados bacterianos, por triplicado, y micelio de *F. solani* creciendo sin bacteria como control.

F. solani mycelial growth. Student *t* test or Mann–Whitney *U* test were implemented depending on data normality (n = 4). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

DNA sequences were manually edited in BioEdit (Hall, 1999). Taxonomic identification at the genus level was assigned based on the sequences best matches in the GenBank nucleotide database (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Results

A total of 270 bacterial isolates was obtained from the rhizosphere and phyllosphere of the four tree species (Table 1). These isolates were grouped into 55 different morphotypes, based on colonial and cellular morphological criteria.

One bacterial isolate per morphotype was randomly selected to be evaluated against *F. solani* in *in vitro* antagonism assays. Of the 55 evaluated isolates, 15 significantly inhibited *F. solani* mycelial growth, with inhibition percentages ranging from 7.09 to 33.04% (Table 2; Figure 1).

Five of these 15 isolates belonged to

Tabla 1. Número de aislados bacterianos obtenidos a partir de la rizósfera y de la filósfera de cuatro especies de árboles de un bosque mesófilo de montaña en Xalapa, Veracruz, México.
Table 1. Number of bacterial isolates obtained from rhizosphere and phyllosphere samples of different tree species from a tropical montane cloud forest in Xalapa, Veracruz, Mexico.

Especie de árbol	Hábitat	Número de aislados bacterianos
<i>Platanus mexicana</i>	Filósfera	71
	Rizósfera	55
<i>Liquidambar styraciflua</i>	Filósfera	50
	Rizósfera	21
<i>Persea schiedeana</i>	Filósfera	9
	Rizósfera	9
<i>Damburneya salicifolia</i>	Filósfera	19
	Rizósfera	36

Las muestras fueron observadas en un microscopio Leica TCS-SP8 + STED (Leica Microsystems, Alemania) con el objetivo 63X Plan Apochromatic (NA 1.4, oil), en modo de luz transmitida.

Análisis de datos

Las mediciones de crecimiento fúngico fueron analizadas con el programa SigmaStat v.3.5. para determinar qué aislados bacterianos inhibieron el crecimiento micelial de *F. solani* de manera significativa ($P \leq 0.05$). Se implementaron pruebas de *t* de Student y *U* de Mann-Whitney, dependiendo de la normalidad de los datos ($n = 4$).

Las secuencias de ADN fueron editadas manualmente en BioEdit (Hall, 1999). La identificación taxonómica a nivel de género fue asignada basada en las secuencias más similares obtenidas a partir de la base de datos de nucleótidos en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Resultados

Se obtuvieron 270 aislados bacterianos a partir de la rizósfera y de la filósfera de cuatro especies de árboles del bosque mesófilo de montaña (Tabla 1). Estos aislados se agruparon en 55 morfotipos, basado en criterios morfológicos coloniales y celulares.

Posteriormente, se seleccionó un aislado bacteriano al azar por morfotipo, para evaluar su actividad antifúngica contra *F. solani* en ensayos de antagonismo *in vitro*. De 55 aislados bacterianos evaluados, 15 lograron inhibir el crecimiento micelial de *F. solani* de manera significativa, con porcentajes de inhibición de hasta 33.04% (Tabla 2; Figura 1). Cinco de estos 15 aislados fueron identificados como pertenecientes al filo Actinobacteria (*Curtobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Frigoribacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Microbacterium* sp.), tres al filo Firmicutes (*Bacillus* spp. y *Staphylococcus* sp.) y dos al

Actinobacteria phylum (*Curtobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Frigoribacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Microbacterium* sp.), three to the Firmicutes phylum (*Bacillus* spp. and *Staphylococcus* sp.) and two to the Proteobacteria phylum (*Pseudomonas* spp.) (Table 2). Five isolates with significant antifungal activity could not be successfully amplified or sequenced in the framework of this study. Moreover, some bacterial isolates induced visible changes in the coloration of *F. solani* mycelium, which produced a pink pigmentation when confronted to the bacteria (Figure 1c). Three bacterial isolates, with percentages of inhibition of *F. solani* mycelial growth higher than 25%, were subsequently randomly selected to evaluate their effect on *F. solani* hyphae with Confocal Laser Scanning Microscopy. The selected isolates were LsH2-009 (bacteria not identified), *Frigoribacterium* sp. LsRi2-001 and *Rhodococcus* sp. PsRi3-003. Hyphal density was visibly lower when mycelium was exposed to bacterial isolates; moreover, hyphae showed evidences of cell wall thickening as well as shorter hyphal segments between septa (Figure 2), as compared with control samples (hyphae not exposed to bacterial isolates).

Discussion

Plant-associated bacteria have gained increasing attention due to the bioactive properties they may present, especially as plant growth promoters or as biocontrol agents of fungal phytopathogens (Santoyo *et al.*, 2012). Our study found 15 bacterial isolates, obtained from the phyllosphere and rhizosphere of tropical montane cloud forest trees, with significant antifungal activity against *F. solani*. The identified isolates mostly belonged to the bacterial genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, and to the phylum Actinobacteria. These bacterial taxa have been previously documented as potential biological control agents against *Fusarium* species, for example against *Fusarium*

Tabla 2. Aislados bacterianos con actividad antifúngica estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) contra *F. solani* en ensayos de antagonismo *in vitro* y su identificación taxonómica.

Table 2. Bacterial isolates with statistical significant antifungal activity ($P \leq 0.05$) against *F. solani* in *in vitro* antagonism assays and their taxonomic identification.

Aislado bacteriano	Especie de árbol	Hábitat	Inhibición del crecimiento micelial (%)	Identificación molecular (número de acceso de GenBank)
PmH1-010	<i>P. mexicana</i>	Filósfera	17.88 ± 1.94	<i>Curtobacterium</i> sp. (MG550918)
PmH1-050	<i>P. mexicana</i>	Filósfera	29.80 ± 2.15	<i>Pseudomonas</i> sp. (MH569190)
PmH2-008	<i>P. mexicana</i>	Filósfera	14.07 ± 1.50	<i>Bacillus</i> sp. (MG550919)
PmRi1-019	<i>P. mexicana</i>	Rizósfera	28.76 ± 6.99	Sin identificar
PmRi3-006	<i>P. mexicana</i>	Rizósfera	7.09 ± 1.36	<i>Microbacterium</i> sp. (MH569196)
LsH1-003	<i>L. styraciflua</i>	Filósfera	27.90 ± 1.17	Sin identificar
LsH1-012	<i>L. styraciflua</i>	Filósfera	23.00 ± 0.58	<i>Pseudomonas</i> sp. (MH569200)
LsH2-009	<i>L. styraciflua</i>	Filósfera	28.45 ± 2.68	Sin identificar
LsRi2-001	<i>L. styraciflua</i>	Rizósfera	27.41 ± 3.21	<i>Frigoribacterium</i> sp. (MH569195)
LsRi2-012	<i>L. styraciflua</i>	Rizósfera	23.96 ± 4.61	Sin identificar
PsRi3-003	<i>P. schiedeana</i>	Rizósfera	33.04 ± 2.58	<i>Rhodococcus</i> sp. (MH569198)
NsRi1-008	<i>D. salicifolia</i>	Rizósfera	18.35 ± 1.68	<i>Micrococcus</i> sp. (MH569194)
NsRi2-012	<i>D. salicifolia</i>	Rizósfera	14.38 ± 2.79	<i>Bacillus</i> sp. (MH569192)
NsRi2-013	<i>D. salicifolia</i>	Rizósfera	15.33 ± 1.19	Sin identificar
NsRi2-017	<i>D. salicifolia</i>	Rizósfera	17.86 ± 4.18	<i>Staphylococcus</i> sp. (MH569193)

Los porcentajes de inhibición representan los valores promedios de cuatro réplicas ± error estándar. La actividad antifúngica significativa fue evaluada a través de pruebas de *t* de Student o de *U* de Mann-Whitney ($P \leq 0.05$).

Percentages of inhibition are average values of four replicates ± standard error. Significant antifungal activity was assessed through Student *t* test or Mann-Whitney *U* tests ($P \leq 0.05$).

filo Proteobacteria (*Pseudomonas* spp.) (Tabla 2). Cinco aislados bacterianos con actividad antifúngica significativa no se lograron secuenciar en el marco de este estudio, debido a problemas con la amplificación de su ADN. Además de reducir el crecimiento del hongo fitopatígeno, algunos aislados indujeron cambios visibles en la coloración del micelio de *F. solani*, produciendo una pigmentación rosada (Figura 1c).

circinatum (Iturrity et al., 2017), *F. oxysporum* (Cawoy et al., 2015; Reverchon et al., 2019), *F. euwallaceae* (Guevara-Avenida et al., 2018) and *F. kuroshium* (Guevara-Avenida et al., 2019; Báez-Vallejo et al., 2020). Their antifungal activity has been mostly attributed to the emission of antimicrobial chemical compounds, such as diffusible lipopeptides or

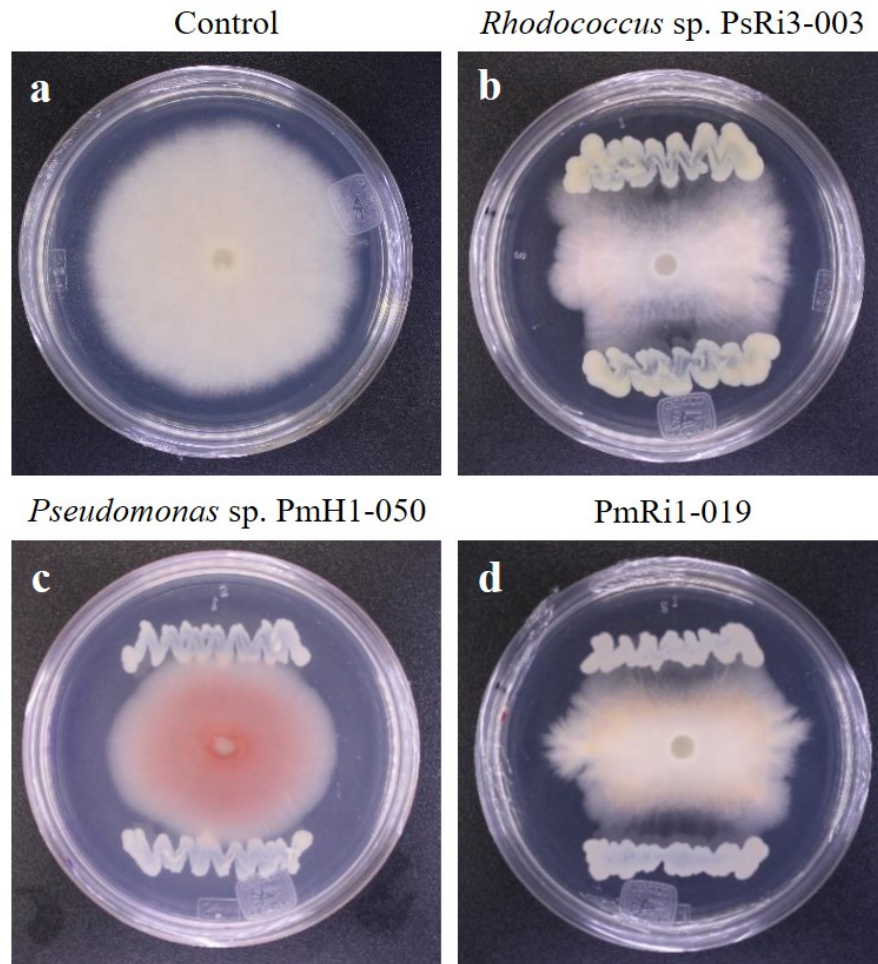


Figura 1. Ensayos de antagonismo *in vitro* de los aislados bacterianos obtenidos de la rizósfera y filósfera de árboles del bosque mesófilo de montaña contra *F. solani*. a) Crecimiento micelial de *F. solani* sin bacteria; b), c), d) Antagonismo de *F. solani* por los tres aislados bacterianos que presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial.

Figure 1. *In vitro* antagonism assays of bacterial isolates obtained from the rhizosphere and phyllosphere of tropical montane cloud forest species against *F. solani*. a) *F. solani* mycelial growth without bacterial treatment; b), c), d) *F. solani* antagonism by the three bacterial isolates presenting the highest percentages of mycelial growth inhibition.

Tres aislados bacterianos, con porcentajes de inhibición de *F. solani* mayores a 25%, fueron seleccionados aleatoriamente para evaluar su efecto en las hifas del hongo por microscopía confocal. Los aislados seleccionados fueron LsH2-009 (sin identificar), *Frigoribacterium* sp. LsRi2-001 y *Rhodococcus* sp. PsRi3-003. Además de una visible disminución de la densidad micelial, las hifas expuestas a los tres aislados seleccionados mostraron evidencias de engrosamiento de la pared celular y de intervalos entre septos más cortos (Figura 2), a comparación con el control (hifas creciendo sin contacto con bacterias).

Discusión

Recientemente, el estudio de la microbiota de las plantas ha ganado interés debido a las propiedades bioactivas que las

2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) (Cazorla *et al.*, 2007; Prabhukarthikeyan *et al.*, 2016; Guevara-Avendaño *et al.*, 2020) or volatile ketones and pyrazines (Yuan *et al.*, 2012; Guevara-Avendaño *et al.*, 2019, 2020; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Furthermore, some bacterial isolates such as *Pseudomonas* sp. PmH1-050 induced the production of pigments in the mycelium of *F. solani*, which suggests a defense mechanism of the phytopathogen against the metabolites or lytic enzymes secreted by the bacteria (Hamzah *et al.*, 2018). Further research thus needs to be carried out to identify the secondary metabolites produced by those isolates with significant antifungal activity and responsible for the observed mycelial growth inhibition or morphological alterations in hyphae.

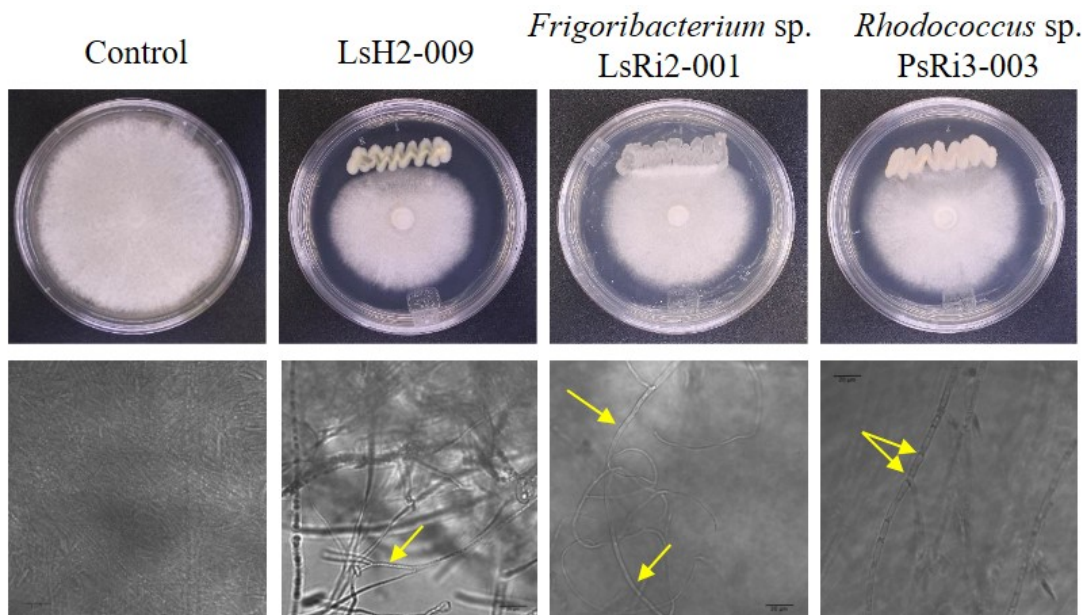


Figura 2. Ensayos de antagonismo e imágenes de microscopía confocal (63×) mostrando la actividad antifúngica de los aislados bacterianos LsH2-009, *Frigoribacterium* sp. LsRi2-001 and *Rhodococcus* sp. PsRi3-003 contra *F. solani*. Las barras de escala representan 20 µm. Las flechas amarillas indican engrosamiento de pared celular o intervalos cortos entre septos.

Figure 2. Antagonism assays and Confocal Laser Scanning Microscopy images (63×) showing the antifungal activity of bacterial isolates LsH2-009, *Frigoribacterium* sp. LsRi2-001 and *Rhodococcus* sp. PsRi3-003 against *F. solani*. Scale bars represent 20 µm. Yellow arrows indicate cell wall thickening or shorter hyphal segments between septa.

bacterias asociadas a las plantas pueden presentar, en particular la capacidad a promover el crecimiento vegetal o a mitigar el impacto de hongos fitopatógenos (Santoyo *et al.*, 2012). En este estudio, se encontraron 15 aislados bacterianos, obtenidos de la rizósfera y de la filósfera de diferentes especies de árboles del bosque mesófilo de montaña, con actividad antifúngica significativa contra *F. solani*. La identificación molecular de estos aislados permitió determinar su pertenencia a los géneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas*, y al filo Actinobacteria. Estos grupos taxonómicos bacterianos han sido reportados anteriormente como fuentes de agentes de biocontrol de varias especies de *Fusarium*, por ejemplo *Fusarium circinatum* (Iturrutxa *et al.*, 2017), *F. oxysporum* (Cawoy *et al.*, 2015; Reverchon *et al.*, 2019), *F. euwallaceae* (Guevara-Avenidaño *et al.*, 2018) y *F. kuroshium* (Guevara-Avenidaño *et al.*, 2019; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Su actividad antifúngica ha sido atribuida a la producción de metabolitos secundarios antimicrobianos, en forma difusibles como algunos lipopéptidos o el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (Cazorla *et al.*, 2007; Prabhukarthikeyan *et al.*, 2016; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2020) o en forma volátil como algunas cetonas o pirazinas (Yuan *et al.*, 2012; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2019, 2020; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Además, algunos aislados como *Pseudomonas* sp. PmH1-050 indujeron la producción de pigmentos en el micelio de *F. solani*, lo que sugiere una reacción de defensa del fitopatógeno contra los metabolitos secundarios o enzimas líticas secretados por la bacteria (Hamzah *et al.*, 2018). Por lo tanto, se requieren más investigaciones enfocadas a la identificación de los metabolitos secundarios producidos por aquellos aislados que mostraron actividad antifúngica significativa, para elucidar cuáles fueron los compuestos químicos responsables de la inhibición de crecimiento

Actinobacteria are particularly interesting candidates for the production of bioactive formulations since they present a wide range of beneficial properties, such as their ability to resist adverse environmental conditions through sporulation, their capacity to produce siderophores and indole acetic acid or to secrete diverse antifungal substances (Jog *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018; Reverchon *et al.*, 2019). Some of the actinobacterial genera detected in the present study have previously been reported for their antimicrobial activity. For example, *Curtobacterium flaccumfaciens* has been shown to reduce the severity of the disease symptoms produced by the bacteria *Xylella fastidiosa* (Lacava *et al.*, 2007). *Microbacterium* sp. inhibited conidia formation in *Phyllosticta citricarpa*, causal agent of citrus black spot (Savi *et al.*, 2019). Finally, species of the genus *Rhodococcus* have been reported to exhibit biocontrol activity against soft rot caused by the bacterium *Pectobacterium atrosepticum* (Barbey *et al.*, 2013), or against fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* (Chiba *et al.*, 1999). In our study, *Rhodococcus* sp. PsRi3-003, isolated from the rhizosphere of *P. schiedeana*, evidenced the highest inhibition percentage of *F. solani* mycelial growth and produced irregular cell wall thickening as well as shorter hyphal segments between septa. These alterations have been previously reported as evidences of antifungal activity (Li *et al.*, 2010; Guevara-Avenidaño *et al.*, 2019). The effectiveness of *Rhodococcus* sp. PsRi3-003 as a biocontrol agent of *F. solani* should therefore be further evaluated in greenhouse bioassays, to confirm its antagonistic activity *in planta* and assess any other potential plant growth promoting property.

The present work contributed to identify several bacterial isolates from a tropical montane cloud forest that were able to inhibit *F. solani*, a ubiquitous fungal pathogen. So far, most reports

micelial o de las alteraciones morfológicas observadas en las hifas.

Las actinobacterias son candidatos particularmente interesantes para la producción de formulaciones bioactivas debido a su capacidad a esporular que les permite resistir a condiciones ambientales adversas, su habilidad a producir sideróforos y ácido indol-acético, y su capacidad a secretar diversas sustancias antifúngicas (Jog *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018; Reverchon *et al.*, 2019).

Algunos de los géneros de actinobacterias detectados en el presente estudio han sido reportados previamente por su actividad antimicrobiana. Por ejemplo, cepas de *Curtobacterium flaccumfaciens* han podido reducir la severidad de los síntomas producidos por la bacteria *Xylella fastidiosa* (Lacava *et al.*, 2007). *Microbacterium* sp. inhibió la formación de conidios en el hongo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal de la mancha negra en cítricos (Savi *et al.*, 2019). Finalmente, algunas especies del género *Rhodococcus* han mostrado actividad de biocontrol contra la pudrición blanda ocasionada por *Pectobacterium atrosepticum* (Barbey *et al.*, 2013), o contra los hongos *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Chiba *et al.*, 1999). En nuestro trabajo, el aislado *Rhodococcus* sp. PsRi3-003, obtenido de la rizósfera de *P. schiedeana*, presentó el porcentaje de inhibición más alto del crecimiento micelial de *F. solani* y ocasionó el engrosamiento diferencial de la pared celular de las hifas, así como un intervalo entre septos más corto. Estas alteraciones morfológicas han sido reportadas anteriormente como evidencias de actividad antifúngica (Li *et al.*, 2010; Guevara-Avendaño *et al.*, 2019). Investigaciones posteriores deben contemplar confirmar la eficiencia del aislado *Rhodococcus* sp. PsRi3-003 como agente de control biológico de *F. solani* en bioensayos de invernadero, para corroborar su actividad antagónica *in planta* y evaluar otras posibles propiedades promotoras de crecimiento vegetal.

of bacteria as biological control agents of fungal diseases have been focused on crop-associated bacteria, and little is known about the bioactivity of forest tree-associated microbes (Cazorla and Mercado-Blanco, 2016). Our research therefore highlights the importance of tropical montane cloud forest microbial diversity as a potential reservoir of microbial strains with biotechnological applications.

Acknowledgements

This research was funded by the National Forestry Commission of Mexico (Comisión Nacional Forestal or CONAFOR) grant number 265677. The authors wish to thank Ofelia Ferrera, Benjamín Rodríguez, Luis Alberto Cruz for their technical assistance. We are also grateful to Francisco Lorea and Luis Tlaxcalteco for their help with Lauraceae identification in the field.

References

El presente estudio permitió identificar aislados bacterianos provenientes del bosque mesófilo de montaña con capacidad de inhibir el crecimiento de *F. solani*, un hongo fitopatógeno cosmopolita. Hasta recientemente, la mayoría de las investigaciones enfocadas a encontrar agentes bacterianos de control biológico de enfermedades fúngicas ha sido centrada en buscar bacterias asociadas a cultivos y otras plantas de interés agrícola; en consecuencia, se desconocen las posibles propiedades bioactivas de los microorganismos asociados a especies silvestres (Cazorla and Mercado-Blanco, 2016). Nuestro trabajo enfatiza la importancia de considerar el bosque mesófilo de montaña como un posible reservorio de cepas microbianas con aplicaciones biotecnológicas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el fondo sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal CONAFOR (Comisión Nacional Forestal) a través del proyecto 265677. Los autores agradecen el apoyo técnico de Ofelia Ferrera, Benjamín Rodríguez, y Luis Alberto Cruz. Agradecemos también a Francisco Lorea y Luis Tlaxcalteco por su ayuda con la identificación de las Lauráceas en campo.

Referencias

- Arfaoui, A., Adam, L.R., Bezzahou, A. and Daayf, F., 2018. Isolation and identification of cultivated bacteria associated with soybeans and their biocontrol activity against *Phytophthora sojae*. *BioControl*, 63(4), pp.607-617. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9873-9>
- Báez-Vallejo, N., Camarena-Pozos, D.A., Monribot-Villanueva, J.L., Ramírez-Vázquez, M., Carrión-Villarnovo, G.L., Guerrero-Analco, J.A., Partida-Martínez, L.P. and Reverchon F., 2020. Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani* and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of Fusarium dieback. *Microbiological Research*, 235, 126440. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126440>
- Barbey, C., Crépin, A., Bergeau, D., Ouchiha, A., Mijouin, L., Taupin, L., Orange, N., Feuilloley, M., Dufour, A., Burini, J.F. and Latour, X., 2013. *In planta* biocontrol of *Pectobacterium atrosepticum* by *Rhodococcus erythropolis* involves silencing of pathogen communication by the rhodococcal gamma-lactone catabolic pathway. *PLoS One*, 8(6), p.e66642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066642>
- Berg, G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnology*, 84, pp.11-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P. and Ongena, M., 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8, pp.281-295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Cazorla, F.M. and Mercado-Blanco, J., 2016. Biological control of tree and woody plant diseases: an impossible task? *BioControl*, 61, pp.233-242. <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9737-0>
- Cazorla, F.M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B.J.J., Vicente, A.D. and Bloemberg, G., 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology*, 103, pp.1950-1959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>
- Chiba, H., Agematu, H., Kaneto, K., Terasawa, T., Kakai, S., Dobashi, K. and Yoshioka, T.,

1999. Rhodopeptins (Mer-N1033), novel cyclic tetrapeptides with antifungal activity from *Rhodococcus* sp. *The Journal of Antibiotics*, 52(8), pp.695-699. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.695>
- De Vrieze, M., Pandey, P., Bucheli, T.D., Varadarajan, A.R., Ahrens, C.H., Weisskopf, L. and Bailly, A., 2015. Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. *Frontiers in Microbiology*, 6, p.1295. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01295>
- Guevara-Avenidaño, E., Bejarano-Bolívar, A.A., Kiel-Martínez, A.L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E.A., Sánchez-Rangel, D., Guerrero-Analco, J.A., Eskalen, A. and Reverchon, F., 2019. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research*, 219, pp.74-83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.009>
- Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K.R., Monribot-Villanueva, J.L., Kiel-Martínez, A.L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J.A. and Reverchon, F., 2020. Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal of Microbiology*, en prensa. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00249-6>
- 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. *forficatus*, and *Phytophthora cinnamomi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111, pp.563-572. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0977-5>
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp.95-98.
- Hamzah, T.N.T., Lee, S.Y., Hidayat, A., Terhem, R., Faridah-Hanum, I. and Mohamed, R., 2018. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. *Frontiers in Microbiology*, 9, p.1707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01707>
- Hunziker, L., Bönisch, D., Groenhagen, U., Bailly, A., Schulz, S. and Weisskopf, L., 2015. *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. *Applied Environmental Microbiology*, 81, pp.821-830. <https://doi.org/10.1128/AEM.02999-14>
- Iturrutxa, E., Trask, T., Mesanza, N., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M. and Patten, C.L., 2017. Biocontrol of *Fusarium circinatum* infection of young *Pinus radiata* trees. *Forests*, 8, p.32. <https://doi.org/10.3390/f8020032>
- Jog, R., Pandya, M., Nareshkumar, G. and Rajkumar, S., 2014. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. *Microbiology*, 160, pp.778-788. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>
- Lacava, P.T., Li, W., Araújo, W.L., Azevedo, J.L. and Hartung, J.S., 2007. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *The Journal of Microbiology*, 45(5), pp.388-393.
- Li, X., Yu, H.Y., Lin, Y.F., Teng, H.M., Du, L. and Ma, G.G., 2010. Morphological changes of *Fusarium oxysporum* induced by CF66I, an antifungal compound from *Burkholderia*

- cepacia*. *Biotechnology Letters*, 32(10), pp.1487-1495.
<https://doi.org/10.1007/s10529-010-0316-7>
- Méndez-Bravo, A., Cortazar-Murillo, E.M., Guevara-Avenidaño, E., Ceballos-Luna, O., Rodríguez-Haas, B., Kiel-Martínez, A.L., Hernández-Cristóbal, O., Guerrero-Analco, J.A. and Reverchon, F., 2018. Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS ONE*, 13(3), p.e0194665.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194665>
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. and van der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews in Microbiology*, 11, pp.789-799.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Prabhukarthikeyan, S.R. and Raguchander, T., 2016. Antifungal metabolites of *Pseudomonas fluorescens* against *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Pure Applied Microbiology*, 10, pp.579-584.
- Reverchon, F., García-Quiroz, W., Guevara-Avenidaño, E., Solís-García, I.A., Ferrera-Rodríguez, O. and Lorea-Hernández, F., 2019. Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against *Fusarium* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50, pp.583-592.
<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00094-2>
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M.D.C. and Govindappa, M., 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22, pp.855-872.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Savi, D.C., Shaaban, K.A., Gos, F.M., Thorson, J.S., Glienke, C. and Rohr, J., 2019. Secondary metabolites produced by *Microbacterium* sp. LGMB471 with antifungal activity against the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa*. *Folia Microbiologica*, 64(3), pp.453-460.
<https://doi.org/10.1007/s12223-018-00668-x>.
- Toledo-Aceves, T., Meave, J.A., González-Espinosa, M. and Ramírez-Marcial, N., 2011. Tropical montane cloud forests: current threats and opportunities for their conservation and sustainable management in Mexico. *Journal of Environmental Management*, 92, pp.974-981.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.007>
- Vorholt, J.A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews in Microbiology*, 10, pp.828-840.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Wang, X., Zhang, M., Gao, J., Pu, T., Bilal, M., Wang, Y. and Zhang, X., 2018. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. *Biological Control*, 127, pp.78-84.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.007>
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q. and Huang, Q., 2012. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, pp.5942-5944.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>