

Actividad inhibitoria de bacterias aisladas de la rizósfera de árboles frutales, en contra de *Phymatotrichopsis omnívora in vitro*

Inhibitory activity of bacteria isolated from the rhizosphere of fruit trees, against *Phymatotrichopsis omnívora in vitro*

Recibido: 22 de septiembre del 2016

Aceptado: 9 de mayo del 2018

Publicado: 17 de octubre del 2018

Lorenza Esther Martínez-Escudero*, Alicia Melgoza-Castillo*, Ramona Pérez-Leal^o, Elizabeth Villalobos Perez*

Cómo citar:

Martínez-Escudero, L. E., Melgoza-Castillo, A., Pérez-Leal, R., & Villalobos Perez, E. (2018). Actividad inhibitoria de bacterias aisladas de la rizósfera de árboles frutales, en contra de *Phymatotrichopsis omnívora in vitro*. *Acta Universitaria*, 28(5), 66-71. doi: 10.15174/au.2018.1606

* Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih., Periférico Francisco R. Almada, Km 1 de la Carretera Chihuahua-Cuauhtémoc. Chihuahua, Chih., México, 31031. Correo electrónico: perezleal@hotmail.com.

^o Autor de correspondencia.

Palabras Clave:

Bacterias antagonistas; *Bacillus subtilis*; biología molecular; rizósfera; semillas de algodón.

Keywords:

Antagonist bacteria; *Bacillus subtilis*; biological control; molecular biology; rhizosphere; cottonseeds.

RESUMEN

Phymatotrichopsis omnívora afecta a un gran número de especies de frutales ocasionando grandes pérdidas económicas, y el uso de agroquímicos para combatirlos ocasionan efectos negativos para el medioambiente, por lo que sería muy útil encontrar alternativas que contribuyan a disminuir el uso de estos químicos. Existen microorganismos nativos del suelo con mecanismos de inhibición hacia diversos patógenos, lo que contribuye al empleo de métodos de control biológico. El objetivo de este trabajo fue seleccionar e identificar cepas de bacterias con capacidad de inhibir el crecimiento de *P. omnívora*, para lo cual se aislaron bacterias de raíces de árboles frutales con presencia de la enfermedad, con el fin de evaluar su efecto antagonístico *in vitro*. Se obtuvieron 88 aislamientos bacterianos, de los cuales se evaluó la capacidad antifúngica mediante enfrentamiento simultáneo del hongo y la bacteria en ensayos por triplicado. Se inocularon semillas de algodón con las cepas que presentaron inhibición importante utilizando cultivos *in vitro*. Las cepas bacterianas M1, N8 y N15 presentaron mayor capacidad biocontroladora y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se identificaron mediante secuenciación del ADN ribosómico 16S.

ABSTRACT

Phymatotrichopsis omnívora affect a great number of fruit species causing great economic losses and the use of agrochemicals to combat them, resulting in adverse environmental effects, so it would be very useful to find alternatives that contribute to reduce the use of these chemicals. There are soil-borne microorganisms with mechanisms of inhibition towards various pathogens, which contribute to the use of biological control methods. The objective of this work was to select and identify bacteria strains capable of inhibiting the growth of *P. omnívora*. To do this, bacteria were isolated from roots of fruit trees with the presence of the disease to evaluate their antagonistic effect *in vitro*. A total of 88 bacterial isolates were obtained, of which the antifungal capacity was evaluated by simultaneous confrontation of the fungus and the bacteria in triplicate assays. Cottonseeds were inoculated with strains that showed significant inhibition, using *in vitro* cultures. The bacterial strains M1, N8 and N15 presented greater biocontrol capacity and, considering the results obtained, they were identified by 16S ribosomal DNA sequencing.

INTRODUCCIÓN

Las raíces secretan una amplia gama de compuestos químicos que juegan un papel importante en las interacciones con la comunidad microbiana y en los cambios de las propiedades físicas del suelo. Las condiciones del suelo y las interacciones microbianas que aquí tienen lugar están involucradas tanto en el aumento de la actividad microbiana para el control de patógenos, como en el proceso de infección ocasionada por los fitopatógenos (Bais, Weir, Perry, Gilroy & Vivanco, 2006; Berendsen, Pieterse & Bakker, 2012; Walker, Bais, Grotewold & Vivanco, 2003; Whipps, 2001). El estudio de estas comunidades de la rizósfera son importantes para desarrollar prácticas de manejo sostenibles y productos agrícolas como biopesticidas (Huang et al., 2014).

Algunos cultivos de importancia económica como el nogal, cultivado en los estados del norte de México, se ven afectados por la enfermedad conocida como "pudrición texana", ocasionada por el hongo *Phymatotrichopsis omnivora* que afecta la productividad y llega a ocasionar la muerte de las plantas (Hernández, 2002; Samaniego-Gaxiola & Herrera-Pérez, 2003); el nogal es un cultivo importante a nivel estatal, generándose pérdidas económicas (Samaniego, Herrera, Pedraza, Jimenez & Chew, 2003; Tarango, 2006; Tood et al., 2007). Las pérdidas anuales ocasionadas por este patógeno han sido calculadas en aproximadamente un millón de dólares, debido a la reducción en la producción de nuez en árboles afectados por este hongo (Samaniego et al., 2003). Se estima que podría haber alrededor de 350 000 árboles de nogal infectados con *Phymatotrichopsis omnivora* en el norte de México (Samaniego-Gaxiola, 2007).

No existe un método de control eficiente para este patógeno (Cook, Riggs, Smart & Mullin-Schading, 1995; Rush, Gerlk & Lyda, 1984), por un lado, el control químico, que además de los problemas de contaminación ambiental que traen consigo la aplicación de fungicidas, es caro, y la práctica de rotación de cultivos poco eficiente debido al tiempo de sobrevivencia de los esclerocios (Adam et al., 2013; Uppalapati, Young, Marek & Mysore, 2010; Yoder et al., 2013). Las asociaciones de las raíces con los microorganismos favorecen a la planta, ya que muchos microorganismos producen ciertas sustancias con capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos que pudieran ser patógenos para la planta (Berendsen et al., 2012), por lo que algunos de estos microorganismos son utilizados como agentes de biocontrol (Ibarra et al., 2006; Lutz, Wenger, Maurhofer, Defago & Duffy, 2004; Whipps, 2001). Existen gran cantidad de microorganismos antagonistas aislados de las raíces y utilizados para el control de enfermedades fungosas y bacterianas de diversos cultivos

(Aquino-Martínez, Vázquez-García & Reyes-Reyes, 2008; Hernández-Rodríguez, Heydrich-Pérez, Velázquez del Valle & Hernández-Lauzardo, 2006; Paredes et al., 2009; Taechowisan, Lu, Shen & Lumyong, 2005), sin embargo, para *P. omnivora* aún no existe un microorganismo capaz de controlarlo efectivamente, por lo que este trabajo tiene como objetivo identificar aquellas bacterias que puedan ser antagonicas para su posterior uso como control biológico de este hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento de las bacterias se muestrearon raíces de árboles de durazno (*Prunus pérsica*), nogal (*Juglans regia*), vid (*Vitis vinifera*), manzano (*Malus domestica*), olmo (*Ulmus spp.*) y olivo (*Olea europaea*), infectados de forma natural por el hongo *P. omnivora*. Las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suelo y se colocaron por separado en un matraz EM con caldo nutritivo. Estas se agitaron por 5 min y se incubaron durante 24 h, a 28 °C. De cada matraz se realizaron seis diluciones seriadas en *buffer* de fosfatos; de las tres últimas diluciones se tomó 0.1 mL y se colocó en cajas de Petri con agar nutritivo. La muestra se extendió con la ayuda de la varilla de Digralsky. Las cajas se incubaron por 48 h a 28 °C.

Los microorganismos que fueron observados con morfología colonial diferente, se separaron para obtener un cultivo puro. Cada cultivo fue identificado mediante un número junto con la inicial del nombre del frutal de donde provenía. Una vez obtenidos los microorganismos en cultivo puro, se les realizó la tinción de Gram y se observaron con un microscopio óptico para comprobar la pureza del cultivo. Para realizar las pruebas de antagonismo, se tomó una asada de cada microorganismo obtenido, y se colocaron en tubos de ensaye con caldo nutritivo y círculos de papel filtro de 5 mm de diámetro, con la finalidad de que los microorganismos se adhirieran al papel filtro e inmediatamente realizar las pruebas de antagonismo.

Pruebas de antagonismo

Se colocó en el centro de cajas de Petri con medio de cultivo de agar de dextrosa y papa (PDA, por sus siglas en inglés) un círculo de agar con micelio de *P. omnivora*, y a 2.0 cm de distancia se colocaron cuatro círculos de papel filtro, tres provenientes del caldo nutritivo impregnado con las bacterias a probar y un círculo impregnado únicamente con caldo nutritivo estéril como testigo. Las pruebas se realizaron por triplicado. Aparte en otra caja de Petri,

se colocó en el centro un círculo de agar con crecimiento micelial de *P. omnivora* para utilizarlo como referencia de crecimiento del hongo. Las cajas se incubaron a 28 °C hasta que el crecimiento del hongo de la caja de referencia cubrió toda la superficie. En este momento se tomó como un 100% de crecimiento para compararlo con el desarrollo en las cajas de las pruebas de antagonismo. A los ocho días de incubación a 28 °C, el hongo testigo cubrió la totalidad de la caja, por lo que se realizaron las mediciones de: el halo de inhibición, es decir, la distancia que separa al hongo del antagonista; del crecimiento radial de la colonia del hongo y el crecimiento radial de la colonia del antagonista. Para determinar la eficiencia del antagonista en la inhibición del hongo, se utilizó la fórmula de Aquino *et al.* (2008): % EA = (CRA-CRP/CRA) × 100, donde: % EA = Eficiencia del antagonista, CRA = Crecimiento radial del antagonista (cm), CRP = Crecimiento radial del patógeno (cm). Además, se realizó el análisis estadístico análisis de varianza (Anava) para el diseño completamente al azar con comparación de medias de Tukey utilizando un nivel de significancia de 0.05, para obtener las cepas que presentaron mejor inhibición del hongo.

Bioensayos en semillas de algodón en cultivo *in vitro*

Se probaron algunas de las cepas que presentaron algún grado de inhibición las cuales fueron cultivadas en caldo nutritivo, posteriormente se sumergieron semillas de algodón en este cultivo. Previamente las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10%, enjuagadas con agua destilada estéril y finalmente sumergidas durante 5 min en el caldo nutritivo de crecimiento de las cepas (Lagunas *et al.*, 2001). Enseguida las semillas se colocaron en tubos de ensayo que contenían medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) inoculado con *P. omnivora*. Se realizaron dos bioensayos: en el primero se colocaron el hongo y la semilla el mismo día, mientras que el segundo se sembró el hongo y cinco días después se sembró la semilla. Las cepas probadas fueron: a) manzano 1 y 2 (M1) y (M2), nogal 8, 13, 14 y 15 (N8, N14, N15), vid 1 y 2 (V1, V2), b) medio de cultivo con inóculo del hongo y c) semillas sin inóculo como testigos (sumergidas en agua estéril). Cada tratamiento consistió de diez repeticiones. Se evaluó la sobrevivencia de la planta a los veinte días de siembra.

Identificación molecular

Después de obtener el DNA genómico, se amplificó la región del RNAr 16S de las tres cepas que mostraron mejores resultados de inhibición. Los primers utilizados para la amplificación de la región 1135 pb fueron 357F (5' CTCCTCGGGAGGCAGCAG'3) y 1492R (CGGCTACCTT-GTTACGACTT) y posteriormente las muestras fueron enviadas para su secuenciación al Instituto de Biotecnología

de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El fragmento fue secuenciado en ambas direcciones. Los resultados de los electroferogramas fueron analizados con el *software 4Peaks*. Una vez que se obtuvieron las secuencias de cada electroferograma para cada cepa, se alineó el par de secuencias con el *software Blast* del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), esto con el fin de eliminar aquellas bases erróneas o bien para insertar las bases faltantes, esto es lo que comúnmente se denomina limpieza de la secuencia.

El análisis bioinformático para identificar el género y especie de cada una de las cepas analizadas se realizó a través de dos programas *Ribosomal Database Project* (<https://rdp.cme.msu.edu/>) y *Blast* (nucleotide-nucleotide) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

RESULTADOS

Aislamiento de microorganismos antagonistas

De las raíces de las cinco diferentes especies con presencia de *P. omnivora*, se obtuvo un total de 88 aislados bacterianos, esta diferencia se determinó mediante la observación de las características morfológicas coloniales. La tinción de Gram mostró bacterias tipo bacilo G (+) y G (-), en donde se observó que las G (+) mostraron los mejores halos de inhibición. La morfología colonial de estas bacterias mostró características típicas del género *Bacillus*, es decir, colonias blancas opacas, aplanadas y de bordes irregulares, mientras que las características microscópicas son formas bacilares Gram positivo. El número de microorganismos aislados fue diferente para cada raíz, así como el número de cepas encontradas con capacidad de inhibir al hongo (tabla 1).

Tabla 1 Número de cepas aisladas de raíces de diversos cultivos y cantidad de cepas inhibitorias de *Phymatotrichopsis omnivora*

Árbol de Procedencia	Cepas bacterianas aisladas	Cepas que producen inhibición
Durazno	18	0
Nogal	14	6
Olmo	23	2
Olivo	11	1
Vid	13	2
Manzano	9	2
Total	88	13

Fuente: Elaboración propia.

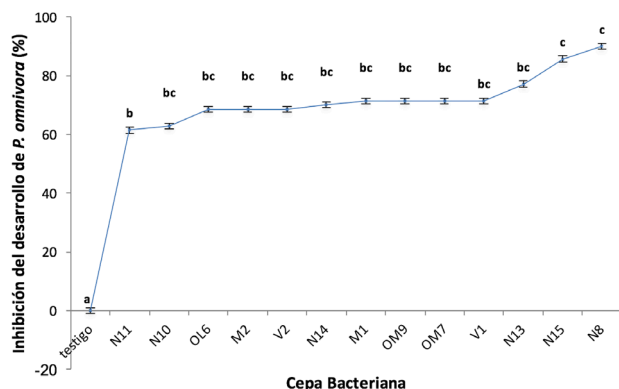


Figura 1

Frecuencia de individuos de acuerdo con la altura (m) en ANT (área testigo), AQP (área de quema prescrita), AIC (área de incendio conducido) y AI (área de incendio forestal). Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2 Crecimiento del hongo *P. omnívora* y de las cepas antagonistas

Cepa	Crecimiento del hongo en cm	Crecimiento antagonista en cm
M1	2.1	2.37
M2	2.2	2.18
N8	1.5	2.31
N10	2.3	1.78
N11	2	1.77
N13	1.3	2.82
N14	1.9	2
N15	1.3	2.80
O16	2.2	2
Om7	2.1	1.95
Om9	2.3	2.14
V1	2	1.97
V2	2.2	1.97

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3 Plantas tratadas con cepas antagonistas sobrevivientes a *P. omnívora*

Número de cepa	Número de plantas sobrevivientes %*	Número de plantas sobrevivientes %**
M1	100.0	44.4
M2	0.0	33.3
N8	87.0	77.7
N13	0	22.2
N14	5.0	11.1
N15	25.0	22.2
V1	0.0	22.2
V2	0.0	11.1
Testigo s/hongo	100.0	100.0
Testigo c/hongo	12.5	22.2

*El hongo y las semillas tratadas con el microorganismo a probar se sembraron el mismo día.

**El hongo se sembró cinco días antes de colocar las semillas tratadas con el microorganismo a probar.

Fuente: Elaboración propia.

Evaluación de la capacidad de antagonismo de las cepas bacterianas

A los 7 días de incubación, 13 de las 88 cepas bacterianas probadas mostraron capacidad de inhibición *in vitro* del desarrollo micelial. Los resultados de los análisis estadísticos indicaron que la mejor inhibición del hongo la presentaron las cepas aisladas del nogal (N15 y N8) con un 80% y 90% de inhibición respectivamente (figura 1). Se observó además que el crecimiento de cada cepa alrededor del círculo de papel filtro fue diferente, es decir, el crecimiento se extendió desde 1.72 cm alrededor del círculo, hasta los 2.87 cm de crecimiento y, aunque el crecimiento fuera abundante, los resultados estadísticos no indicaron que fuera el que proporcionó mejor inhibición (tabla 2). Esto concuerda con lo señalado por Duffy, Schouten & Raaijmakers (2003), que, así como los antagonistas microbianos poseen mecanismos para dominar las interacciones con los patógenos, los patógenos tienen diversas respuestas para contrarrestar el antagonismo.

Bioensayos en semillas de algodón en cultivo *in vitro*

Se observa cierta efectividad en la protección de las plantas cultivadas *in vitro* en algunos de los tratamientos. Las cepas M1, N8 y N15 presentaron actividad protectora de la semilla para ambos tratamientos, aquí se obtuvo el mayor número de plantas sobrevivientes en comparación con las plantas sin tratamiento para ambos ensayos (tabla 3). De forma global se aprecia que el mayor número de plantas sobrevivientes se presentó cuando se sembraron las semillas cinco días después de haber sembrado el hongo, sin embargo, cuando se sembraron al mismo tiempo, se tuvo una protección del 100% y 87% con las cepas M1 y N8 respectivamente (tabla 3).

Identificación molecular

Los resultados obtenidos mostraron que las tres cepas amplificaron el producto esperado, determinándose que las cepas bacterianas (M1, N8 y N15) aisladas de nogal (N) y manzano (M), resultaron identificadas como pertenecientes al género *Bacillus* de la especie *subtilis*.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio determinaron que las cepas M1, N8 y N15, identificada como *B. subtilis* presentaron inhibición hacia *P. omnívora*, lo cual concuerda con otros estudios relacionados con el aislamiento de microorganismos del suelo, en donde se observa mayormente la presencia de *Bacillus* así como su capacidad de inhibir

microorganismos fitopatógenos, como *P. omnivora*, ya sea por competencia de espacio y nutrientes (Swain & Ray, 2007), o por la capacidad que tienen estas bacterias de sintetizar moléculas antifúngicas (Benítez, Bentley, Bustamante, Consuelo-Sánchez & Corrales, 2007; Layton, Monroy, Maldonado, Corrales & Sánchez, 2011; López-Valenzuela et al., 2015; Sarabia, Pedraza, Trujillo & Abud, 2010). El desarrollo bacteriano abundante no tiene influencia directa en la inhibición del hongo, ya que en este estudio las dos cepas que presentaron estadísticamente la mejor inhibición (N15 y N8) no necesariamente fueron las que presentaron un mejor crecimiento, ya que la N11 presenta un desarrollo colonial un poco menor e inhibió el desarrollo del hongo aunque no significancia estadística, de acuerdo con Cano (2011) puede ser debido a que existen factores que pueden modificar las interacciones entre microorganismos ya que manejan diversos tipos, modos y mecanismos de acción, relacionados con la competencia por espacio y nutrientes.

CONCLUSIONES

La cepa de *Bacillus subtilis* N8 y N15 son las que provoca la mayor disminución del micelio del *P. omnivora*. Las cepas de *Bacillus subtilis* M1 evaluadas con semillas de algodón probadas en cultivo *in vitro*, ofreció la mejor protección contra la enfermedad ocasionada por *P. omnivora*. Utilizando los organismos que comparten el mismo medio ambiente se puede tener un manejo integrado y disminuir el uso de agroquímicos evitando el daño que ocasionan al medio ambiente.

REFERENCIAS

- Adam, M., Heuer, H., & Hallmann, J. (2014). Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. *PLoS ONE*, *9*(2), e90402.
- Aquino-Martínez, J. G., Vázquez-García, L. M., & Reyes-Reyes, B. G. (2008). Biocontrol *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. Y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos antagonistas nativos de la zona florícola de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *26*(2), 127-137.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, G. L., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, *57*, 233-66.
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Consuelo-Sánchez, L., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizósfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *Nova*, *5*(8), 147-153.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science August*, *17*(8), 478-486.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *14*(2), 15-31.
- Cook, C. G., Riggs, J. L., Smart, J. R., & Mullin-Schading, B. A. (1995). Evaluation of six kenaf cultivars for resistance to *Phymatotrichum omnivorum*. *Industrial Crops and Products*, *4*, 229-232. doi: [https://doi.org/10.1016/0926-6690\(95\)00037-D](https://doi.org/10.1016/0926-6690(95)00037-D)
- Duffy, B., Schouten, A., & Raaijmakers, J. M. (2003). Pathogen self-defense; mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, *41*, 501-538. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095606>
- Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Velázquez del Valle, M. G., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2006). Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *24*(1), 42-49.
- Hernández, H. V. (2002). *Manejo integrado de enfermedades en el cultivo del algodónero*. Memorias del IV curso regional de aprobación en el control de plagas del algodónero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna. Departamento de Parasitología. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Sistema Nacional de aprobación Fitosanitaria. Torreón, Coahuila, México.
- Huang, X. F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, *92*, 267-275.
- Ibarra, J. E., Rincón-Castro, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J. A., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., Pardo, L., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Soberón, M., & Bravo, A. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *48*(2), 113-120.
- Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada, S., Aranda, S., Luna, I., & Vaquera, H. (2001). *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *19*(1), 57-65.
- Layton, C., Monroy, L., Maldonado, E., Corrales, L. C., & Sánchez, L. C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, *9*(15), 113-214.
- López-Valenzuela, B. E., Armenta-Bojórquez, A. D., Hernández-Verdugo S., Apodaca-Sánchez, M. A., Samaniego-Gaxiola, J. A., Leyva-Madrigal, K. Y., & Valdez-Ortiz, A. (2015). Selección *in vitro* e identificación de aislados de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp. nativos para el control de *Phymatotrichopsis omnivora*. *ITEA*, *11*(4), 310-325. doi: <https://doi.org/10.12706/itea.2015.020>
- Lutz, M. P., Wenger, S., Maurhofer, M., Defago, G., & Duffy, B. (2004). Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. *FEMS Microbiology Ecology*, *48*, 447-455. doi: <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.002>

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Paredes, E. J. E., Carrillo, J. A., García, R. S., Allende, R., Sañudo, J. A., & Valdez, J. B. (2009). Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicerarietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 27-35.
- Rush, C. M., Gerlk, T. J., & Lyda, S. D. (1984). Interactions between *Phymatotrichum omnivorum* and *Sorgum bicolor*. *Plant Disease*, 68(6), 500-501.
- Samaniego, G. J. A., Herrera, P. T., & Santamaría, C. J. (1998). *Influencia de las condiciones de suelo y manejo de las huertas de nogal pecanero con el incremento de la pudrición texana y pérdidas en el cultivo*. VI Simposium Internacional Nogalero. Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM), campus Laguna. Torreón, Coahuila, México.
- Samaniego-Gaxiola, J. A. (2007). Perspectivas de la investigación en *Phymatotrichopsis omnívora* y la enfermedad que causa. *Agricultura Técnica en México*, 33(3), 309-318.
- Samaniego-Gaxiola, J. A., & Herrera-Pérez, T. (2003). Producción de nuez en nogales (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) atacados por *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennébert. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 323-330.
- Samaniego, J. A., Herrera, T., Pedroza, A., Jiménez, F., & Chew, Y. (2003). Fluctuación de la severidad de pudrición texana *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert en nogal pecanero (*Carya illinoensis* K.) bajo condiciones de la Comarca Lagunera México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 143-151.
- Sarabia O. M., Pedraza, R. M., Trujillo, M. M., & Abud, Y. (2010) Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.
- Swain, M. R., & Ray, R. C. (2007). Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, 164(2), 121-130. doi: 10.1016/j.micres.2006.10.009
- Taechowisan, T., Lu, Ch., Shen, Y., & Lumyong, S. (2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*, 151, 1691-1695. doi: 10.1099/mic.0.27758-0
- Tarango, S. (2006). Fenología y botánica de genotipos de pistachero (*pistacia* spp.) seleccionados para la formación de portainjertos resistentes al hongo *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert. *Revista Chapingo*, 5, 1-11.
- Tood, W., Nye, D., Aloysius, M., Miller, C., Lester, J., & Martinez, T. (2007). Inoculación, síntomas y colonización en arboles de manzano en contenedor por *Phymatotrichopsis omnívora* (Duggar) Hennebert. *Agrociencia*, 41(4), 459-468.
- Uppalapati, S. R., Young, C., Marek, S., & Mysore, K. (2010). *Phymatotrichum* (cotton) root rot caused by *Phymatotrichopsis omnívora*: retrospects and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 11, 325-34.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132, 44-51. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>
- Watson, W. T., Kenerley, C. M., & Appel, D. N. (2000). Visual and infrared assessment of root colonization of apple trees by *Phymatotrichum omnivorum*. *Plant Disease*, 84(5), 539-543.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* (Special Issue), 52, 487-511.
- Wightwick, A. M., Salzman, S. A., Reichman, S. M., Allinson, G., & Menzies, N. W. (2013). Effects of copper fungicide residues on the microbial function of vineyard soils. *Environmental Science Pollution Research*, 20(3), 1574-1585. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1114-7>
- Yoder, J. A., Jajack, A. J., Rosseloti, A. E., Smith, T. J., Yerke, M. C., & Sammataro, D. (2013). Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76, 587-600. doi: <http://doi.org/10.1080/15287394.2013.798846>