

Antagonistic bacteria against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea* in maize (*Zea mays*)

Bacterias antagonistas contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíz (*Zea mays*)

Ana María Ayala-Torres, Sergio Aranda-Ocampo*, Carlos De León-García de Alba, Cristian Nava-Díaz, Postgrado en Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; Jesús Ricardo Sánchez-Pale, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo carretera Toluca-Ixtlahuaca km. 15.5, Piedras Blancas 50200, Toluca de Lerdo, México.

*Corresponding autor: arandasergio63@gmail.com

Received: August 03, 2022.

Accepted: March 25, 2023.

Ayala-Torres AM, Aranda-Ocampo S, De León-García de Alba C, Nava-Díaz C and Sánchez-Pale JR. 2023. Antagonistic bacteria against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea* in maize (*Zea mays*). Mexican Journal of Phytopathology 41(2).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2208-2>

First DOI publication: April 14, 2023.

Primera publicación DOI: 14 de Abril, 2023.

Abstract. Fungal sclerotia house native bacterial populations of interest for biological control of plant pathogenic fungi. The objectives of this research were: i) to explore the bacterial populations associated with *Claviceps gigantea* sclerotia in maize from six locations in the State of Mexico, ii) to evaluate the *in vitro* antagonism of these bacterial populations against three species of *Fusarium* phytopathogens of maize, iii) to

Resumen. Los esclerocios de algunos hongos albergan bacterias nativas para el control biológico de hongos fitopatógenos. Los objetivos de esta investigación fueron: i) explorar poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *Claviceps gigantea* en maíces de seis localidades del Estado de México, ii) evaluar el antagonismo *in vitro* de estas poblaciones bacterianas contra tres especies de *Fusarium* fitopatógenos de maíz, iii) identificar molecularmente los antagonistas más eficientes y caracterizar la producción de metabolitos *in vitro*. Poblaciones bacterianas en los esclerocios se calcularon por conteo directo en placa; el antagonismo *in vitro* contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se evaluó por confrontación en medio Waksman agar. Las bacterias antagonistas se identificaron por secuenciación parcial del gen 16S rRNA y se evaluaron *in vitro* para la producción de ácido indol-3-acético, sideróforos, actividad lipolítica, proteolítica y solubilización de fosfato mineral. La densidad bacteriana estuvo entre

molecularly identify the more efficient antagonists and characterize the *in vitro* production of metabolites. Bacterial populations in the sclerotia were calculated by direct plate count; *in vitro* antagonism against *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides* was evaluated by confrontation in Waksman agar medium. Antagonistic bacteria were identified by partial sequencing of 16S rRNA gene and evaluated *in vitro* for the production of indole-3 acetic acid, siderophores, lipolytic and proteolytic activity, and mineral phosphate solubilization. The bacterial density ranged from 2.023 to 2.397 Log₁₀UFC g⁻¹ of sclerotia. Twenty-two strains showed *in vitro* antagonism against at least one *Fusarium* species and were identified as members of the genera *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus*, and *Stenotrophomonas*. The 22 antagonists showed *in vitro* lipolytic, proteolytic, siderophore-producing and phosphate-solubilizing activity; only 12 (55%) produced indole-3-acetic acid. *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) strains were antagonists against the three *Fusarium* species and produced all the metabolites evaluated.

Key words: Ear rot, *Bacillus*, *Pseudomonas*, inhibition, metabolites.

Zea mays, commonly known as corn, is the most widely produced cereal crop worldwide, with wheat and rice following as close contenders (CIMMYT, 2019). It is worth noting that Mexico is considered the center of origin for corn (Matsuoka *et al.*, 2002) and has the largest annual planted area and per capita consumption of this crop (García-López and Giraldo, 2021; Padrón *et al.*, 2013). However, Mexico's corn production and grain

2.023 a 2.397 Log₁₀UFC g⁻¹ de esclerocio. Veintidos cepas mostraron antagonismo *in vitro* contra al menos una especie de *Fusarium*. Se identificaron como miembros de los géneros *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*. Los 22 antagonistas mostraron *in vitro* actividad lipolítica, proteolítica, produjeron sideróforos y solubilizaron fósforo; únicamente 12 (55%) produjeron ácido indol-3-acético. Las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron todos los metabolitos evaluados.

Palabras clave: Pudrición de mazorca, *Bacillus*, *Pseudomonas*, inhibición, metabolitos.

El maíz (*Zea mays*) es el cereal más producido en el mundo, seguido de trigo y arroz (CIMMYT, 2019). México es el centro de origen del maíz (Matsuoka *et al.*, 2002), además de ser el cultivo con la mayor superficie anual sembrada y consumo per cápita (García-López y Giraldo, 2021; Padrón *et al.*, 2013). En México se estima que la producción y calidad de grano de este cultivo es afectado por diversas enfermedades fúngicas, destacando las enfermedades de pudrición de la mazorca (Moreno-Limón *et al.*, 2011).

El hongo *Fusarium* causa pudriciones de mazorca que representa una limitante en la producción e inocuidad del maíz a nivel mundial. Se considera que la mayoría de los híbridos de maíz cultivados en el mundo son susceptibles a más de 10 especies de *Fusarium* que causan pudrición de la mazorca (Mesterhazy *et al.*, 2012). La mayoría de estas especies de *Fusarium* producen micotoxinas que afectan la salud no solo de animales sino también de los seres humanos (Holf, 2020; Mielniczuk

quality are often compromised by several fungal diseases, among which corn ear rot diseases are particularly prevalent (Moreno-Limón *et al.*, 2011).

Fusarium fungi cause corn ear rot, which poses a significant limitation on the production and safety of corn worldwide. It is reported that most corn hybrids cultivated globally are susceptible to more than 10 *Fusarium* species causing ear rot (Mesterhazy *et al.*, 2012). These species typically produce mycotoxins that affect not only animal health but also human health (Holf, 2020; Mielniczuk and Skwaryło-Bednarz, 2020). In Mexico, *F. verticillioides* is the most widely distributed and important species causing ear rot in the states of Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Puebla, and Nuevo Leon. Additionally, *F. graminearum* and *F. subglutinans* have also been reported to cause ear rot in the states of Mexico, Michoacan, and Yucatan (Zenteno-Zevada, 1963).

Biocontrol of plant diseases with antagonistic microorganisms is a useful strategy to reduce the use of pesticides in agriculture and lower production costs and environmental impact (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán and Santoyo 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Previous studies have shown that exudates from the sclerotia of phytopathogenic fungi such as *Sclerotium rolfsii* and *Sclerotinia sclerotiorum* stimulate the growth of specific bacterial populations in the same agroecosystem with greater antifungal activity against these same fungi, compared to bacterial strains isolated from other ecological niches (Abdullah *et al.*, 2008; Coley-Smith and Dickenson, 1971; Gilbert and Linderman, 1971; Hou *et al.*, 2006). Bacterial populations that coexist in specific habitats with limited nutrients, such as sclerotia, promote the production of metabolites that increase their ability to compete against other microorganisms. Therefore, sclerotia of fungi are considered potential natural reservoirs of

and Skwaryło-Bednarz, 2020). En México, se reporta a *F. verticillioides* como la especie de mayor distribución y más importante por causar pudriciones en mazorca en los estados de Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Puebla y Nuevo León. También se han reportado a *F. graminearum* y *F. subglutinans* causando pudriciones en mazorca en los estados de México, Michoacán y Yucatán (Zenteno-Zevada, 1963).

El biocontrol de enfermedades en plantas con microorganismos antagonistas es una estrategia útil para aminorar el uso de plaguicidas en la agricultura y disminuir costos de producción e impacto ambiental (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán y Santoyo 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022). Investigaciones previas han demostrado que los exudados en los esclerocios de hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotinia sclerotiorum* estimulan el crecimiento de poblaciones bacterianas específicas en el mismo agroecosistema con mayor actividad antifúngica hacia estos mismos hongos, que cepas bacterianas aisladas de otros nichos ecológicos (Abdullah *et al.*, 2008; Coley-Smith y Dickenson, 1971; Gilbert y Linderman, 1971; Hou *et al.*, 2006). Las poblaciones bacterianas que coexisten en hábitats específicos con escasos nutrientes, como es el caso de los esclerocios, promueven la producción de metabolitos que incrementan su capacidad de competencia contra otros microorganismos; por lo tanto, se considera que los esclerocios de hongos son potenciales reservorios naturales de antagonistas eficientes para el control biológico de fitopatógenos (Hou *et al.*, 2006; Zachow *et al.*, 2011).

El ascomiceto *Claviceps gigantea* causa la enfermedad “diente de caballo” así llamada por la forma de los esclerocios. Este hongo produce alcaloides principalmente ergolina, festuclavina, dihydroelymoclavina, chanooclavina y elimoclavina (Agurell *et al.*, 1963; Solano-Báez *et al.*, 2018) que

efficient antagonists for the biological control of phytopathogens (Hou *et al.*, 2006; Zachow *et al.*, 2011).

Claviceps gigantea, an ascomycete, causes the disease commonly known as “horse’s tooth” due to the shape of its sclerotia. This fungus produces several alkaloids, mainly ergoline, festuclavine, dihydroelymoclavine, chanoclavine, and elimoclavine, which are also toxic to both animals and humans (Aguirell *et al.*, 1963; Solano-Báez *et al.*, 2018; Mielniczuk and Skwaryło-Bednarz, 2020; Bragg *et al.*, 2017; Hof, 2020). *C. gigantea* is an endemic fungus limited geographically to locations in Mexico with altitudes above 1800 masl and relative humidity $\geq 60\%$ (Fucikovsky and Moreno, 1976; Fuentes *et al.*, 1964; Ullstrup, 1973). In the high valleys of Mexico (>2000 masl), maize is grown in environments with temperate climates, where ear rots caused by *Fusarium* spp. are common, often occurring simultaneously with *C. gigantea*, causing losses of up to 100% (CIMMYT, 2004). In this study, we hypothesize that *C. gigantea* sclerotia harbor bacterial populations with efficient antagonism against *Fusarium* species causing maize ear rot in Mexico. Our objectives were to: i) explore the bacterial populations associated with *C. gigantea* sclerotia in the State of Mexico, ii) evaluate the *in vitro* antagonism of these bacterial populations against *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides*, iii) molecularly identify the most efficient antagonists and characterize the *in vitro* production of their metabolites.

MATERIALS AND METHODS

Collecting *Claviceps gigantea* sclerotia

Sclerotia of *C. gigantea* were collected from six localities in the State of Mexico, which showed

también son tóxicos para animales y seres humanos (Mielniczuk y Skwaryło-Bednarz, 2020; Bragg *et al.*, 2017; Hof, 2020). *C. gigantea* es un hongo endémico, geográficamente limitado a localidades en México con altitudes mayores a los 1800 msnm y humedad relativa $\geq 60\%$ (Fucikovsky y Moreno, 1976; Fuentes *et al.*, 1964; Ullstrup, 1973). En los valles altos de México (>2000 msnm), el maíz se cultiva en ambientes con climas templados en donde las pudriciones de mazorca causadas por *Fusarium* spp. son comunes en infecciones simultáneas con *C. gigantea* causando pérdidas de hasta el 100% (CIMMYT, 2004). En el presente estudio, se infiere que los esclerocios de *C. gigantea* albergan poblaciones bacterianas con antagonismo eficiente contra especies de *Fusarium* que causan la pudrición de mazorca de maíz en México. Los objetivos de esta investigación fueron: i) explorar las poblaciones bacterianas asociadas a esclerocios de *C. gigantea* en el Estado de México, ii) evaluar el antagonismo *in vitro* de estas poblaciones bacterianas contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, iii) identificar molecularmente los antagonistas más eficientes y caracterizar la producción *in vitro* de metabolitos de los antagonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de esclerocios de *Claviceps gigantea*

Los esclerocios de *C. gigantea* se colectaron en seis localidades del Estado de México con historial severo en condiciones naturales de las enfermedades diente de caballo y pudriciones de mazorca causados por *Fusarium* spp. (Cuadro 1; Figura 1). Los esclerocios de cada localidad se colectaron de mazorcas infectadas con *C. gigantea* sin síntomas de pudrición por *Fusarium* spp.

severe history under natural conditions of “horse tooth” disease and ear rot caused by *Fusarium* spp. (see Table 1 and Figure 1). For each locality, sclerotia were collected from *C. gigantea*-infected ears without symptoms of rot caused by *Fusarium* spp.

Aislamiento de bacterias de esclerocios de *Claviceps gigantea*

Se colectaron 10 esclerocios de *C. gigantea* en cada localidad. El tamaño de muestra del número de esclerocios se calculó con el modelo descrito

Table 1. Collection of *C. gigantea* sclerotia in localities of the State of Mexico.
Cuadro 1. Colecta de esclerocios de *C. gigantea* en localidades del Estado de México.

¹ Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)
Almoleya de Juárez	19° 14' 10"	90° 42' 07"	2600
Atacomulco	19° 43' 37"	99° 42' 12"	2700
Calimaya	19° 10' 25"	99° 32' 12"	2680
Mina México	19° 40' 35"	99° 40' 10"	2580
Toluca	18° 59' 00"	99° 40' 58"	2600
Villa Victoria	19° 26' 00"	100° 00' 00"	2570

²Sample size of 10 sclerotia per locality estimated with Cochran's model (1982). / ²Tamaño de muestra de 10 esclerocios por localidad estimado con el modelo de Cochran (1982).

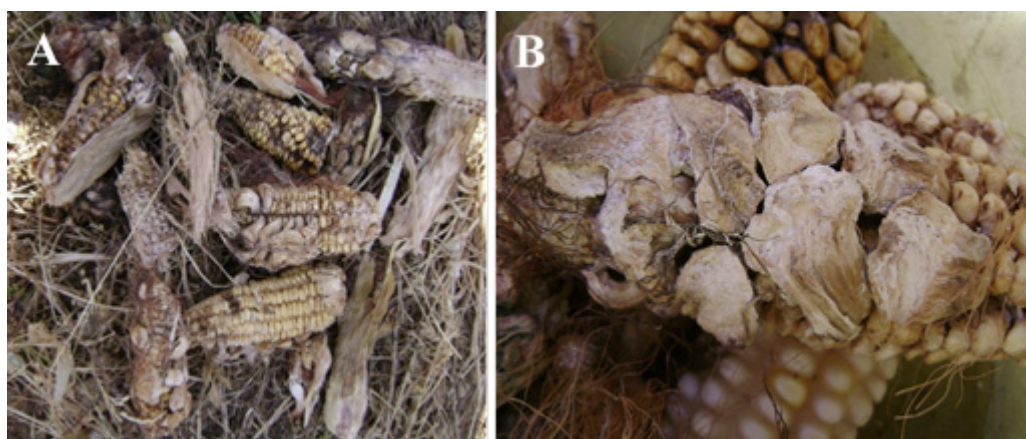


Figure 1. A) Corn ears with simultaneous infection of *Claviceps gigantea* and *Fusarium* spp. B) *Claviceps gigantea* sclerotia on corn ears.

Figura 1. A) Mazorcas de maíz con infección simultánea de *Claviceps gigantea* y *Fusarium* spp. B) Esclerocios de *C. gigantea* en mazorcas de maíz.

Isolation of bacteria from *Claviceps gigantea* sclerotia

Ten sclerotia of *Claviceps gigantea* were collected from each of the six locations. The sample

por Cochran (1982). Los esclerocios (n=10) de cada localidad se molieron por separado en un mortero estéril; de aquí, se utilizó 1 g de esclerocios molidos diluido en 100 mL de agua destilada estéril para realizar diluciones seriadas hasta 10^{-4} ; de cada

size for the number of sclerotia was determined using the model described by Cochran (1982). The sclerotia (n=10) from each location were ground separately in a sterile mortar. One gram of ground sclerotia was diluted in 100 mL of sterile distilled water to perform serial dilutions up to 10^{-4} . From each dilution, 100 μ L was plated on Petri dishes with R2A culture medium (Difco) in triplicate and incubated at 28 °C for 24 h. Bacterial growth was quantified using the direct plate count method, and microbial density was expressed in Log_{10} CFU g^{-1} of sclerotium (Peng *et al.*, 2009). A total of 129 bacterial isolates associated with sclerotia, exhibiting different colony morphology observed under a stereoscopic microscope (American Optical AO), were selected from the six sampled locations for further study of *in vitro* antagonism.

***In vitro* antagonism against *Fusarium* spp.**

The *in vitro* antagonism of 129 bacterial strains was evaluated against three *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides*) responsible for ear rot in the sampled locations. The pathogenicity of these strains was experimentally verified in seedlings of three native populations of corn in the State of Mexico by inoculating the fungus in the substrate. The internal regions ITS of the rRNA 18S-5.8S and 5.8S-28S genes were molecularly identified through amplification, provided by Dr. Dolores Briones Reyes from the Graduate Program of Genetic Resources and Productivity of the Colegio de Postgraduados. *In vitro* antagonism was evaluated by dual confrontation on square Petri dishes (120 x 120 mm) with Waksman agar culture medium, which was selected from King's B media, R2A, nutrient agar, and potato-dextrose agar, as it allowed optimal growth of both *Fusarium* species and bacterial isolates. The initial

dilución se sembraron 100 μ L en placas Petri con medio de cultivo R2A (Difco) con tres repeticiones y se incubaron a 28 °C por 24 h. Del crecimiento bacteriano se cuantificó el número de colonias por el método de conteo directo en placa. La densidad microbiana se expresó en Log_{10} UFC g^{-1} de esclerocio (Peng *et al.*, 2009). Entre las seis localidades muestreadas, se seleccionaron 129 aislados bacterianos asociados a los esclerocios con diferente morfología de la colonia observada en un microscopio estereoscópico (American Optical AO) para el estudio posterior de antagonismo *in vitro*.

Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp.

Se evaluó el antagonismo *in vitro* de 129 cepas bacterianas contra *Fusarium graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* que causan pudrición de mazorca en las localidades muestreadas; la patogenicidad de estas cepas se evidenció experimentalmente en plántulas de tres poblaciones nativas de maíz en el Estado de México por inoculación del hongo en sustrato y se identificaron molecularmente por amplificación de las regiones internas ITS de los genes rRNA 18S-5.8S y 5.8S-28S las cuales fueron donadas por la Dra. Dolores Briones Reyes del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, del Colegio de Postgraduados. El antagonismo *in vitro* se evaluó por confrontación dual en placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) con medio de cultivo Waksman agar seleccionado entre los medios B de King, R2A, agar nutritivo y papa-dextrosa agar por ser el que permitió el óptimo crecimiento tanto de *Fusarium* spp. como de los aislados bacterianos. Inicialmente, las cepas de *Fusarium* spp. se inocularon por extensión con un asa L-digralsky sobre la superficie del medio de cultivo con 300 μ L de una suspensión acuosa con 1.8×10^4 conidios mL^{-1} cuantificados en una Cámara Neubauer de cada especie con cinco días a 28 °C en

inoculation of *Fusarium* species strains was carried out by extension with an L-digralsky loop on the culture medium surface, and the inoculated Petri dishes were kept at room temperature for 60 min. Bacteria (n=129) were subsequently inoculated with a multi-point inoculator (Boekel®, 96-point microplate replicator) and incubated at 28 °C for 7 days. Bacterial strains that showed antagonism (inhibition halo of fungal growth) against one or more *Fusarium* species were selected. In another assay, antagonistic bacterial strains were individually inoculated by puncturing the bacterial mass with a sterile stick under the same experimental conditions as the previous assay. Only bacterial strains that showed antagonism by forming an inhibition halo ≥ 5 mm of mycelial growth against one, two, or all three evaluated *Fusarium* species were selected. Daily observations were made, and the assay was repeated three times. Controls consisted of Petri dishes with growth of *Fusarium* species in the absence of antagonistic bacteria.

Qualitative detection of metabolite production

The antagonistic bacteria were qualitatively characterized for their ability to produce metabolites *in vitro*, such as indole-3-acetic acid, using soy tryptone broth (TSB) as the culture medium. Bacterial strains that produced a reddish coloration in the medium were considered positive (Frey-Klett *et al.*, 2005), while siderophores were assessed using the universal medium chrome azurol S (CAS), with bacterial strains that evidenced a yellow halo around the colony being considered positive (Schwyn and Neilands, 1987). Lipolytic and proteolytic activities were evaluated using nutrient agar supplemented with Tween 80 and TSB medium supplemented with skimmed milk, respectively. Bacterial strains that evidenced an opaque and clear halo around the colony were

medio Waksman agar (1 L) (agar 20 g, glucosa 10 g, KH_2PO_4 1.0 g, MgSO_4 0.5 g, peptona 5.0 g, pH 6.8). Las placas de Petri inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente por 60 min; en seguida, las bacterias (n=129) se inocularon con un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 96 puntos) y se incubaron a 28 °C por 7 días; de aquí, se seleccionaron las cepas bacterianas que evidenciaron antagonismo (halo de inhibición del crecimiento fúngico) contra una o más especies de *Fusarium*. Posteriormente, en otro ensayo las cepas bacterianas antagonistas se sembraron individualmente por punción de masa bacteriana con un palillo estéril bajo las mismas condiciones experimentales del ensayo anterior. Se realizaron observaciones diarias y se seleccionaron únicamente las cepas bacterianas que mostraron antagonismo evidenciado por la formación de un halo de inhibición ≥ 5 mm del crecimiento del micelio contra una, dos o las tres especies de *Fusarium* evaluadas. El ensayo se repitió tres veces. Los testigos consistieron en placas de Petri con crecimiento de las especies de *Fusarium* en ausencia de las bacterias antagonistas.

Detección cualitativa de la producción de metabolitos

Las bacterias antagonistas se caracterizaron cualitativamente en cuanto a su capacidad para producir metabolitos *in vitro* como el ácido indol-3-acético en el medio de cultivo caldo soja triptona (TSB); se consideraron positivas las cepas bacterianas que produjeron una coloración rojiza en el medio (Frey-Klett *et al.*, 2005) y sideróforos en el medio universal cromo azurol S (CAS) considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo amarillo alrededor de la colonia (Schwyn and Neilands, 1987); actividad lipolítica en el medio agar nutritivo suplementado con Tween 80 y proteolítica en el medio TSB suplementado con leche

considered positive for lipolytic and proteolytic activities (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Mineral phosphate solubilization was assessed using TCP medium, with bacterial strains that evidenced an opaque halo around the colony being considered positive (El-Yazeid *et al.*, 2007). All evaluations were performed in triplicate.

Molecular identification of antagonistic bacteria

The DNA of the potential antagonists was obtained from individual colonies with 72 h of growth at 28 °C on Waksman agar medium using the PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Partial amplification of the 16S rRNA gene was carried out using the primers 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and 1492R (3' GGTTACCTTGTTACGACTT 5') and PCR conditions described by Baker *et al.* (2003). The amplified products were sequenced (Sanger sequencing) at MacroGen Inc. (Seoul, Korea) (<https://www.macrogen.com>); the sequences were compared in the gene bank (GenBank) of the International Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) using the Blastn (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ algorithm (Altschul *et al.*, 1990).

RESULTS

Bacterial population density in *Claviceps gigantea* sclerotia

The study revealed bacterial growth in R2A culture medium obtained from sclerotia at all sampling locations. Colony counting was performed to determine bacterial density in *C. gigantea* sclerotia, which varied from 2.023 to

descremada, considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo opaco y claro alrededor de la colonia respectivamente (Hantsis-Zacharov y Halpern, 2007), y solubilización de fosfato mineral en el medio TCP, considerando positivas las cepas bacterianas que evidenciaron un halo opaco alrededor de la colonia (El-Yazeid *et al.*, 2007). Todas las evaluaciones se hicieron por triplicado.

Identificación molecular de las bacterias antagonistas

El ADN de los antagonistas potenciales se obtuvo de colonias individuales con 72 h de crecimiento a 28 °C en medio Waksman agar con el kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación parcial del gen 16S rRNA se realizó con los iniciadores 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (3' GGTTACCTTGTTACGACTT 5') y las condiciones de PCR descritas por Baker *et al.* (2003). Los productos amplificados se secuenciaron (secuenciación Sanger) en MacroGen Inc. (Seul, Korea) (<https://www.macrogen.com>); las secuencias se compararon en el banco de genes (GenBank) del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) empleando el algoritmo Blast_n (Basic Local Alignment Search Tool) 2.2.29+ (Altschul *et al.*, 1990).

RESULTADOS

Densidad de poblaciones bacterianas en esclerocios de *Claviceps gigantea*

Se observó crecimiento bacteriano en medio de cultivo R2A de los esclerocios provenientes de

2.397 Log₁₀CFU g⁻¹ of sclerotium across the six sampling sites (Table 2). Notably, the highest bacterial density was found in Atlacomulco lots (2.397) and the lowest in Villa Victoria (2.023) Log₁₀CFU g⁻¹ of sclerotium. These findings imply the presence of bacterial populations associated with *C. gigantea* sclerotia exudates. Nevertheless, further research is required to investigate factors that influence bacterial density and structure in this ecological niche.

todas las localidades muestreadas. Del crecimiento bacteriano se cuantificó el número de colonias por el método de conteo directo en placa y la densidad bacteriana en esclerocios de *C. gigantea* fue diferente entre las seis localidades muestreadas en rangos desde 2.023 hasta 2.397 Log₁₀UFC g⁻¹ de esclerocio (Cuadro 2). La mayor densidad bacteriana se registró en los lotes de Atlacomulco (2.397) y la menor en Villa Victoria (2.023) Log₁₀UFC g⁻¹ de esclerocio respectivamente. Lo anterior sugiere

Table 2. Bacterial density (Log₁₀UFC g⁻¹) in *C. gigantea* sclerotia by sampling location.

Cuadro 2. Densidad bacteriana (Log₁₀UFC g⁻¹) en esclerocios de *C. gigantea* por localidad de muestreo.

Localidad	Número de colonias	Log ₁₀ UFC g ⁻¹ de esclerocio
Almoloya de Juárez	^z 204.1	2.309
Atlacomulco	249.9	2.397
Calimaya	188.8	2.276
Mina México	200.4	2.301
Toluca	133.6	2.125
Villa Victoria	105.6	2.023

^z Average number of colonies isolated from 10 *C. gigantea* sclerotia per location sampled by direct plate count on R2A medium with three replicates. / ^z Promedio del número de colonias aisladas de 10 esclerocios de *C. gigantea* por localidad muestreada mediante conteo directo en placa en medio R2A con tres repeticiones.

***In vitro* antagonism against *Fusarium* spp.**

Out of 129 morphologically different bacterial strains isolated from sclerotia, 22 (17%) were identified by their *in vitro* antagonism (inhibition halo of fungal growth \geq 5 mm) against one or more species of *Fusarium* (Table 3). Among these, 13 bacterial strains (59%) were isolated from the Atlacomulco location, and three strains (13%) from each of the Calimaya, Mina, and Toluca locations. Among the antagonists (n=22), 10 (45%) strains were antagonistic to *F. verticillioides*, 14 (63%) to *F. subglutinans*, and 17 (81%) to *F. graminearum*.

que existen poblaciones bacterianas asociadas a los exudados de los esclerocios de *C. gigantea*; sin embargo, es necesario profundizar más en investigaciones que evidencien los factores que influyen la densidad y estructura bacteriana en este nicho ecológico.

Antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* spp.

De 129 cepas bacterianas morfológicamente diferentes aisladas de esclerocios, 22 (17%) se identificaron por su antagonismo *in vitro* (halo de inhibición del crecimiento fúngico \geq 5 mm) contra una o más especies de *Fusarium* (Cuadro 3). Entre

Table 3. Molecular identification, origin, antagonism against *Fusarium* spp. and metabolite production of 22 antagonistic strains isolated from sclerotia of *Claviceps gigantea*.

Cuadro 3. Identificación molecular, origen, antagonismo contra *Fusarium* spp. y producción de metabolitos de 22 cepas antagonistas aisladas de esclerocios de *Claviceps gigantea*.

ID cepa	Localidad	Identificación por secuenciación parcial del gen 16S rRNA	No. acceso de secuencias tipo de la especie (NCBI)	% de identidad	Antagonismo <i>in vitro</i>			Producción de metabolitos <i>in vitro</i>				
					² Fg	Fs	Fv	AIA	LIP	PRO	SID	SFM
BA1	Atzacmulco	<i>Bacillus subtilis</i>	KF021537.1	99.39	+	+	+	+	+	+	+	+
BA2	Atzacmulco	<i>Pseudomonas syringae</i>	NR_043716.1	99.28	+	+	+	+	+	+	+	+
BA3	Atzacmulco	<i>Delftia lacustris</i>	KF054933.1	99.46	+	-	+	-	+	+	+	+
BA4	Mina	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AM913974.1	99.40	+	-	+	-	+	+	+	+
BA5	Calimaya	<i>Delftia acidovorans</i>	EF564190.1	99.38	+	-	+	-	+	+	+	+
BA6	Calimaya	<i>Sphingobacterium</i> sp.	KF777439.1	99.41	+	-	-	-	+	+	+	+
BA7	Atzacmulco	<i>Pseudomonas geniculata</i>	JX042457.1	99.44	+	-	-	-	+	+	+	+
BA8	Mina	<i>Micromonospora</i> sp.	KY015111.1	99.44	-	+	-	-	+	+	+	+
BA9	Mina	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	FJ859699.1	99.37	-	+	-	-	+	+	+	+
BA10	Calimaya	<i>Staphylococcus aureus</i>	LN929738.1	99.49	+	+	-	-	+	+	+	+
BA11	Atzacmulco	<i>Pseudomonas putida</i>	KC582298.1	99.05	+	+	-	+	+	+	+	+
BA12	Toluca	<i>Bacillus</i> sp.	HM032893.1	99.48	+	+	-	+	+	+	+	+
BA13	Atzacmulco	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GU198115.1	99.47	+	+	-	+	+	+	+	+
BA14	Atzacmulco	<i>Bacillus subtilis</i>	KF527828.1	99.35	+	+	-	-	+	+	+	+
BA15	Atzacmulco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KC494392.1	99.02	+	+	-	+	+	+	+	+
BA16	Atzacmulco	<i>Pseudomonas putida</i>	KC582298.1	99.16	+	+	-	+	+	+	+	+
BA17	Atzacmulco	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GU198113.1	99.40	-	+	-	+	+	+	+	+
BA18	Atzacmulco	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MH781489.1	99.02	+	+	+	+	+	+	+	+
BA19	Atzacmulco	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ991143.2	99.05	-	+	+	-	+	+	+	+
BA20	Toluca	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MF765339.1	99.48	+	-	+	+	+	+	+	+
BA21	Atzacmulco	<i>Pseudomonas putida</i>	JX120503.1	99.15	+	-	+	+	+	+	+	+
BA22	Toluca	<i>Bacillus</i> sp.	MF510169.1	99.48	-	-	+	+	+	+	+	+

²Fg= *Fusarium graminearum*; Fs=*Fusarium subglutinans*; Fv=*Fusarium verticillioides*; IAA=indole-3-acetic acid production; LIP= lipolytic activity; PRO= proteolytic activity; SID= siderophore production; SFM= mineral phosphate solubilization. / ²Fg= *Fusarium graminearum*; Fs=*Fusarium subglutinans*; Fv=*Fusarium verticillioides*; AIA = producción de ácido indol-3-acético; LIP= actividad lipolítica; PRO= actividad proteolítica; SID= producción de sideróforos; SFM= solubilización de fosfato mineral.

+ = *in vitro* antagonism (inhibition halo ≥ 5 mm). / += antagonismo *in vitro* (halo de inhibición ≥ 5 mm).

Among the antagonistic bacteria, the strains *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) stood out, which were antagonistic against the three evaluated species of *Fusarium*. These three strains originated from the Atzacmulco location (Table 3).

estas, 13 cepas bacterianas (59%) fueron aisladas de la localidad de Atzacmulco, y tres cepas (13%) en cada una de las localidades Calimaya, Mina y Toluca. Entre los antagonistas (n=22), 10 (45%) cepas fueron antagonistas a *F. verticillioides*, 14 (63%) a *F. subglutinans* y 17 (81%) a *F. graminearum*. Entre las bacterias antagonistas destacaron las cepas

Molecular identification of antagonists

The identification of the 22 antagonist strains was made possible through partial amplification of the 16S rRNA gene, which showed a similarity range of 99.02% to 99.49% when aligned against the NCBI gene bank (refer to Table 3). These strains belonged to various genera, including *Pseudomonas* (36.3%), *Bacillus* (31.8%), *Delftia* (9.09%), *Stenotrophomonas* (9.09%), *Micromonospora* (4.5%), *Sphingobacterium* (4.5%), and *Staphylococcus* (4.5%). Notably, *P. putida* (37.5%), *P. fluorescens* (25%), *P. geniculata*, and *P. syringae* (12.5%) were identified among the *Pseudomonas* species, while *B. amyloliquefaciens* (57.1%) and *B. subtilis* (28.5%) were the most common among the *Bacillus* species. It is worth mentioning that the majority of the antagonists (n=13) were isolated from Atlacomulco (59%), while the remaining strains (n=3) (14.3%) were obtained in equal proportions from Calimaya, Mina, and Toluca, respectively (refer to Table 2). Taxonomically, these 22 strains were distributed across four phyla and six orders, with the Firmicutes (Gram-positive) and Proteobacteria (Gram-negative) phyla, as well as the Bacillales and Pseudomonadales orders, having a higher abundance of *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. Conversely, the *Micromonospora*, *Sphingobacterium*, and *Staphylococcus* genera were less abundant, with the Firmicutes (Gram-positive) and Bacteroidetes (Gram-negative) phyla, as well as the Actinomycetales, Sphingobacteriales, and Bacillales orders, having the least number of strains (refer to Table 4).

Qualitative *in vitro* production of metabolites

The 22 antagonists showed *in vitro* lipolytic and proteolytic activity, produced siderophores, and solubilized mineral phosphate; however, only

Bacillus subtilis (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) las cuales fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* evaluados. Estas tres cepas tuvieron origen en la Localidad de Atlacomulco (Cuadro 3).

Identificación molecular de antagonistas

La amplificación parcial del gen 16S rRNA permitió la identificación de las 22 cepas antagonistas entre 99.02 y 99.49% de similitud de acuerdo al alineamiento en el banco de genes del NCBI (Cuadro 3). Las cepas antagonistas pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (36.3%), *Bacillus* (31.8%), *Delftia* (9.09%), *Stenotrophomonas* (9.09%), *Micromonospora* (4.5%), *Sphingobacterium* (4.5%) y *Staphylococcus* (4.5%). Entre las especies de *Pseudomonas*, se identificaron a *P. putida* (37.5%), *P. fluorescens* (25%), *P. geniculata* y *P. syringae* (12.5%); entre las especies de *Bacillus* a *B. amyloliquefaciens* (57.1%) y *B. subtilis* (28.5%). El mayor número de antagonistas (n=13) se aisló de la localidad de Atlacomulco (59%) y el resto en igual proporción (n= 3) (14.3%) de las localidades de Calimaya, Mina y Toluca respectivamente (Cuadro 2). Las 22 cepas antagonistas se distribuyeron taxonómicamente en cuatro Phyla y seis órdenes. Se registró mayor abundancia de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* en los Phyla Firmicutes (Gram positivas) y Proteobacteria (Gram negativas) y en los órdenes Bacillales y Pseudomonadales respectivamente. La menor abundancia en los géneros *Micromonospora*, *Sphingobacterium* y *Staphylococcus*, en los Phyla Firmicutes (Gram positivas) Bacteroidetes (Gram negativas), en los órdenes Actinomycetales, Sphingobacteriales y Bacillales respectivamente (Cuadro 4).

Producción cualitativa *in vitro* de metabolitos

Los 22 antagonistas mostraron *in vitro* actividad lipolítica, proteolítica, produjeron sideróforos

Table 4. Taxonomic distribution of 22 bacterial strains antagonistic *in vitro* against *Fusarium* spp. isolated from sclerotia of *C. gigantea*.

Cuadro 4. Distribución taxonómica de 22 cepas bacterianas antagonistas *in vitro* contra *Fusarium* spp. aisladas de esclerocios de *C. gigantea*.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Frecuencia %
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	36.3
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	31.8
Proteobacteria	Beta Proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Delftia</i>	9.1
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	9.1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Sphingobacterium</i>	4.5
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	4.5
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	4.5

12 (55%) produced indole-3-acetic acid. Only the strains *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) were antagonistic against the three species of *Fusarium* and produced all the evaluated metabolites (Figure 2, Table 3).

y solubilizaron fosfato mineral; sin embargo, solamente 12 (55%) produjeron ácido indol-3-acético. Únicamente las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron todos los metabolitos evaluados (Figura 2, Cuadro 3).

DISCUSSION

In this study, we estimated bacterial density in *C. gigantea* sclerotia and evaluated their *in vitro* antagonism against three *Fusarium* species causing ear rot in maize. Our results showed varying bacterial densities associated with *C. gigantea* sclerotia across the different sampled locations. The highest bacterial density was recorded in the lots of Atlacomulco (2.397), while the lowest was observed in Villa Victoria (2.023) Log₁₀CFU g⁻¹ of sclerotium. This variation may be attributed to the use of agrochemical products and/or residues as part of the agronomic management of the crop, which may have affected the diversity and density of microorganisms associated with maize cultivation (FAO, 2010). Thus, there is a need for further research to examine the impact of agrochemical residues used in the sampled sites on

DISCUSIÓN

En esta investigación se estimó la densidad bacteriana en esclerocios de *C. gigantea* y se evaluó su antagonismo *in vitro* contra tres especies de *Fusarium* causantes de pudrición de mazorca en maíz. Los resultados mostraron diferente densidad bacteriana asociada a esclerocios de *C. gigantea* en las diferentes localidades muestreadas; la mayor densidad bacteriana se registró en los lotes de Atlacomulco (2.397) y la menor en Villa Victoria (2.023) Log₁₀UFC g⁻¹ de esclerocio respectivamente. Lo anterior puede deberse a la utilización de productos y/o residuos agroquímicos utilizados como parte del manejo agronómico del cultivo que pudieron afectar la diversidad y densidad de microorganismos asociados al cultivo del maíz (FAO, 2010), lo cual sugiere la necesidad de conducir estudios sobre

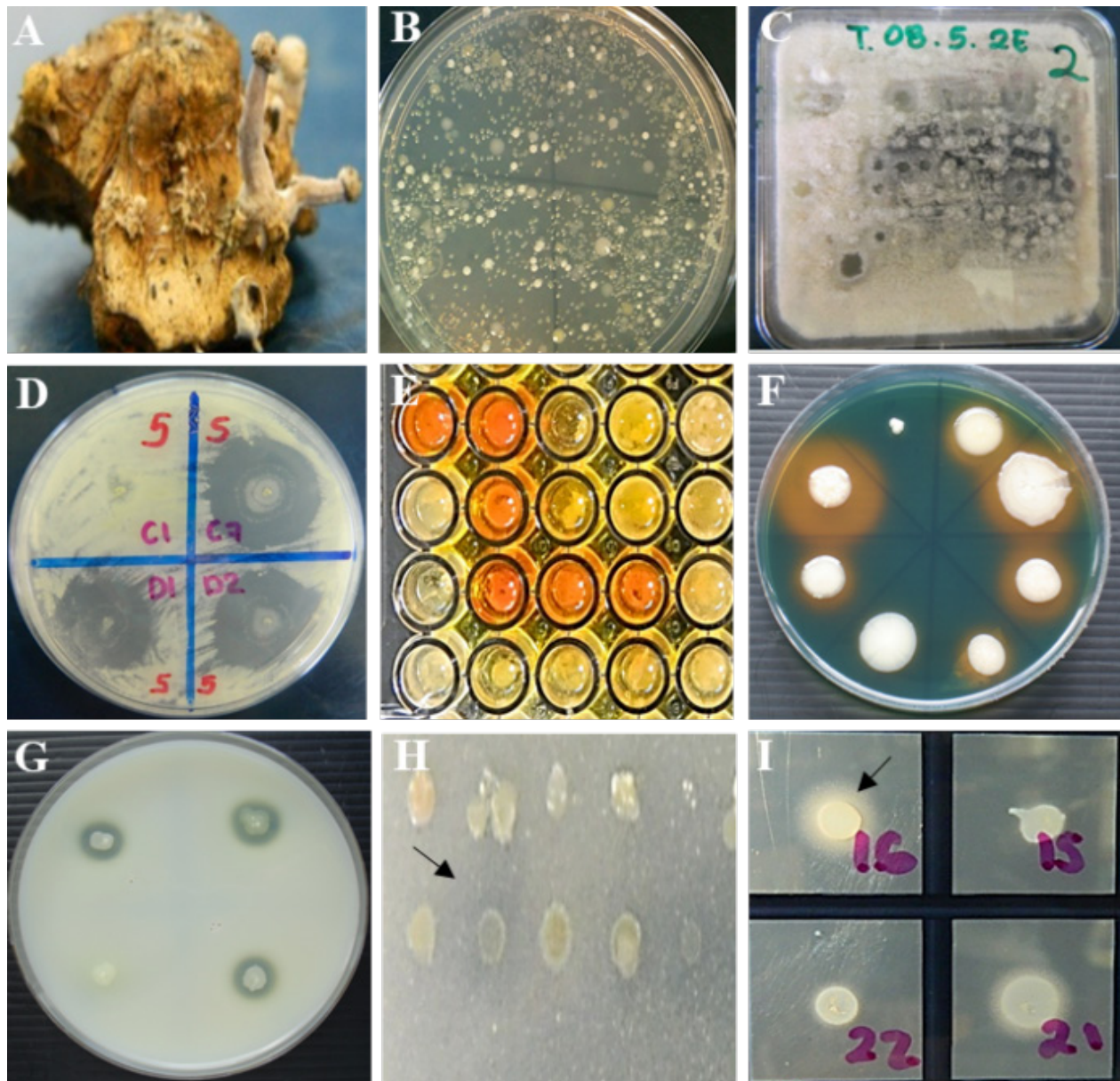


Figure 2. *In vitro* antagonism. A) Sclerotia of *C. gigantea*, B) bacterial growth from 1 g of sclerotia on R2A medium, C) *in vitro* antagonism of bacteria in Waksman agar culture medium inoculated with a multipoint inoculator (Boekel®, 96-point microplate replicator 96 points) against *Fusarium* spp. D) selection of antagonistic bacterial strains showing inhibition zones ≥ 5 mm of fungal growth of *Fusarium* spp. *In vitro* production of metabolites by antagonistic strains. E) production of indole-3-acetic acid, F) production of siderophores, G) proteolytic activity, H) mineral phosphate solubilization, I) lipolytic activity. Strains that showed reddish coloration of the medium, yellow, clear and opaque halo around the colony, respectively, were considered positive.

Figura 2. Antagonismo *in vitro*. A) esclerocio de *C. gigantea*, B) crecimiento bacteriano a partir de 1 g de esclerocio en medio R2A, C) antagonismo *in vitro* de bacterias en medio de cultivo Waksman agar inoculadas con un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 96 puntos) contra *Fusarium* spp. D) selección de cepas bacterianas antagonistas evidenciando halos de inhibición ≥ 5 mm del crecimiento fúngico de *Fusarium* spp. Producción *in vitro* de metabolitos por antagonistas. E) producción de ácido indol-3-acético, F) producción de sideróforos, G) actividad proteolítica, H) solubilización de fósforo mineral, I) actividad lipolítica. Se consideraron positivas las cepas que evidenciaron coloración rojiza del medio, halo amarillo, claro y opaco alrededor de la colonia respectivamente.

the structure and diversity of bacterial communities in sclerotia. Additionally, it has also been shown that bacterial density is closely related to the sources of carbon contained in sclerotia exudates (Coley-Smith and Dickenson, 1971). Hence, future research should focus on identifying the sources of carbon present in *C. gigantea* sclerotia exudates and their quantity. Previous studies have shown that bacterial populations are associated with sclerotia. Coley-Smith and Dickenson (1971) found that the *Sclerotium cepivorum* fungus sclerotia favor the growth of specific bacteria due to the exudates containing carbon sources such as ethanol, trehalose, glucose, and mannitol, and that this microenvironment constitutes a specific ecological niche. Similarly, Gilbert and Linderman (1971) reported qualitative changes and increased microbial activity in soil near *Sclerotium rolfisii* sclerotia attributed to the exudates in the sclerotia of this pathogen. These authors coined the term “mycosphere” to describe the portion of soil influenced by sclerotia, which harbors bacterial populations with a greater representation of antagonistic species against *S. rolfisii* than those obtained from other ecological niches.

In this study, 129 bacterial strains were isolated from sclerotia in various sampled locations. Of these, 22 (17%) showed *in vitro* antagonism against one or more *Fusarium* species that cause maize ear rot, indicated by a fungal growth inhibition halo of ≥ 5 mm. Through partial sequencing of the 16S rRNA gene, it was possible to identify the 22 antagonistic bacterial strains as belonging to the genera *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus*, and *Stenotrophomonas*.

The most abundant antagonists in *C. gigantea* sclerotia belonged to the genera *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) and *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%). In both genera, their mechanisms for phytopathogen biocontrol

los residuos de agroquímicos utilizados en los sitios muestreados y su efecto en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas en los esclerocios. Así mismo, se ha demostrado que la densidad bacteriana está estrechamente relacionada con las fuentes de carbono contenidas en los exudados de esclerocios (Coley-Smith y Dickenson, 1971) por lo que investigaciones futuras deberán enfocarse en determinar las fuentes de carbono presentes en los exudados de los esclerocios de *C. gigantea* y en qué cantidad se encuentran. La presencia de bacterias asociadas a esclerocios se ha evidenciado en otras investigaciones. Coley-Smith y Dickenson (1971) evidenciaron que los esclerocios del hongo *Sclerotium cepivorum*, favorecen el crecimiento de bacterias específicas debido a los exudados que contienen fuentes de carbono como etanol, trehalosa, glucosa y manitol y que este microambiente constituye un nicho ecológico específico. Gilbert y Linderman (1971) reportaron cambios cualitativos e incremento de la actividad microbiana en el suelo cercano a los esclerocios de *Sclerotium rolfisii* atribuido a los exudados en los esclerocios de este patógeno. Estos autores denominaron “micosfera” a la porción de suelo influenciado por los esclerocios y demostraron que albergan poblaciones bacterianas con mayor representatividad de especies antagonicas contra *S. rolfisii* que las obtenidas de otros nichos ecológicos.

En esta investigación, de 129 cepas bacterianas aisladas de esclerocios de las diferentes localidades muestreadas, 22 (17%) de ellas se identificaron por su antagonismo *in vitro* (halo de inhibición del crecimiento fúngico ≥ 5 mm) contra una o más especies de *Fusarium* que causan pudrición de mazorca de maíz. Mediante la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, fue posible identificar a las 22 cepas bacterianas antagonistas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Delftia*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas*

mediated by antibiosis, competition for nutrients and space, promotion of growth, and induction of resistance in plants have been elucidated (Cui *et al.*, 2019; Dimkić *et al.*, 2022; Fira *et al.*, 2018; Guzmán-Guzmán and Santoyo, 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

The findings of this investigation align with those of previous studies, which have highlighted the prevalence of both *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) and *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%) genera colonizing *Rhizoctonia solani* sclerotia (Zachow *et al.*, 2011) and *Sclerotium cepivorum* (Backhouse and Stewart, 1989; Utkhede and Rahe, 1980), demonstrating their strong antagonism against these pathogens. *Stenotrophomonas* genus was also identified in this research. Wong and Hughes (1986) have shown that *Bacillus* species constitute 80% of antagonists isolated from soil and *S. cepivorum* sclerotia samples. This genus includes a group of Gram-positive bacteria with high phenotypic and genetic heterogeneity, considered among the most common colonizers in various ecological niches (Abriouel *et al.*, 2011). Although most of the identified strains in this study were *in vitro* antagonistic against one or two *Fusarium* species, *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), *B. subtilis* (BA1), and *Pseudomonas syringae* (BA2) strains were antagonistic against all three evaluated *Fusarium* species (*F. graminearum*, *F. subglutinans*, and *F. verticillioides*) causing maize ear rot.

In other studies, *B. amyloliquefaciens* has been reported as an antagonist with high potential for the biocontrol of other *Fusarium* species in spinach (*Spinacia oleracea*) (Zhao *et al.*, 2014), banana (*Musa* sp.) (Tian *et al.*, 2021), tomato (*Solanum lycopersicum*) (Elanchezhian *et al.*, 2018; Proca *et al.*, 2020), and wheat (*Triticum* sp.) (Ursan *et al.*, 2019). Some strains of *B. amyloliquefaciens* have been reported as antagonists and efficient

Los antagonistas más abundantes en esclerocios de *C. gigantea* pertenecieron a los géneros *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) (36.3%) y *Bacillus* (Bacillaceae) (31.8%). En ambos géneros se han dilucidado sus mecanismos para el biocontrol de fitopatógenos mediado por antibiosis, competencia por nutrientes y espacios, promoción del crecimiento e inducción de resistencia en plantas (Cui *et al.*, 2019; Dimkić *et al.*, 2022; Fira *et al.*, 2018; Guzmán-Guzmán y Santoyo, 2022; Luo *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2022).

Los resultados de esta investigación coinciden con los obtenidos en otras investigaciones en donde destacan la mayor abundancia de ambos géneros colonizando esclerocios de *Rhizoctonia solani* (Zachow *et al.*, 2011) y *Sclerotium cepivorum* (Backhouse y Stewart, 1989; Utkhede y Rahe, 1980) evidenciando fuerte antagonismo contra estos patógenos, además del género *Stenotrophomonas* el cual también se identificó en esta investigación. Wong y Hughes (1986) demostraron que el 80% de los antagonistas aislados de muestras de suelo y esclerocios de *S. cepivorum* fueron especies del género *Bacillus*. Este género incluye un grupo de bacterias Gram positivas con alta heterogeneidad fenotípica y genética considerados entre los colonizadores más comunes en diversos nichos ecológicos (Abriouel *et al.*, 2011). En este estudio, la mayoría de las cepas identificadas fueron antagonistas *in vitro* contra una o dos especies de *Fusarium*; sin embargo, las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18), *B. subtilis* (BA1) y *Pseudomonas syringae* (BA2) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* evaluados (*F. graminearum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*) causantes de pudrición de mazorca de maíz.

En otras investigaciones, *B. amyloliquefaciens* se ha reportado como antagonista con alto potencial para el biocontrol de otras especies de *Fusarium* en espinaca (*Spinacia oleracea*) (Zhao *et al.*,

biocontrol agents against *F. graminearum* (de Ángel *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019) and *F. verticillioides* (Xu *et al.*, 2021).

The prevalence and antagonism of *B. subtilis* isolated from sclerotia of *C. gigantea* coincides with other studies. Utkhede and Rahe (1980) showed that there is a greater prevalence of *B. subtilis* in *S. cepivorum* sclerotia collected from various parts of the world and that most of these strains significantly protected onion (*Allium cepa*) from white rot caused by this pathogen when inoculated into seed at the time of planting. These authors attributed the prevalence of *B. subtilis* to specific carbohydrates contained in the exudates of *S. cepivorum* sclerotia. Also, strains of *B. subtilis* have shown antagonism and efficient biocontrol against *F. graminearum* and *F. verticillioides* in wheat and maize, respectively (Cavaglieri *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021).

The genus *Pseudomonas* includes Gram-negative species which have been widely studied as an alternative in the biological control of phytopathogens and promotion of plant growth (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán and Santoyo, 2022; Singh *et al.*, 2022). *Pseudomonas syringae*, identified in this study as an antagonist against the three species of *Fusarium*, belongs to the *P. fluorescens* species complex and has been described as an important biocontrol agent along with *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, and *P. putida* (Panpatte *et al.*, 2016). *Pseudomonas syringae* is a species complex that includes phytopathogenic strains on a wide range of host plants (Baltrus *et al.*, 2017). However, non-phytopathogenic strains of *P. syringae* have been identified whose genome harbors an extensive group of genes related to the biocontrol of phytopathogens, promotion of growth, and induction of resistance in plants

(2014), banano (*Musa* sp.) (Tian *et al.*, 2021), tomate (*Solanum lycopersicum*) (Elanchezhyan *et al.*, 2018; Proca *et al.*, 2020) y trigo (*Triticum* sp.) (Ursan *et al.*, 2019). Algunas cepas de *B. amyloliquefaciens* se han reportado como antagonistas y eficientes agentes de biocontrol de *F. graminearum* (de Ángel *et al.*, 2021; Gu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019) y *F. verticillioides* (Xu *et al.*, 2021).

La prevalencia y antagonismo de *B. subtilis* aislado de esclerocios de *C. gigantea*, coincide con otros estudios. Utkhede y Rahe (1980) demostraron que existe mayor prevalencia de *B. subtilis* en esclerocios de *S. cepivorum* colectados de varias partes del mundo y que la mayoría de estas cepas protegieron significativamente a la cebolla (*Allium cepa*) de la pudrición blanca causado por este patógeno cuando se inocularon en semilla al momento de la siembra. Estos autores atribuyeron la prevalencia de *B. subtilis* a los carbohidratos específicos contenidos en los exudados de los esclerocios de *S. cepivorum*. También, cepas de *B. subtilis* han mostrado antagonismo y eficiente biocontrol contra *F. graminearum* y *F. verticillioides* en trigo y maíz respectivamente (Cavaglieri *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2021).

El género *Pseudomonas* incluye especies Gram negativas las cuales han sido ampliamente estudiadas como una opción en el control biológico de fitopatógenos y promoción del crecimiento de plantas (Dimkić *et al.*, 2022; Guzmán-Guzmán y Santoyo 2022; Singh *et al.*, 2022). *Pseudomonas syringae* identificada en este estudio como antagonista contra las tres especies de *Fusarium* pertenece al complejo de especies de *P. fluorescens* y se ha descrito como una especie importante como agente de biocontrol junto con *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* y *P. putida* y (Panpatte *et al.*, 2016). *Pseudomonas syringae* es un complejo de especies que incluye cepas fitopatógenas en

(Passera *et al.*, 2019). Yu *et al.* (2017) showed that the *Pseudomonas syringae* BAF.1 strain completely inhibited the germination of conidia and affected the structure of the mycelium of *Fusarium oxysporum*, proposing it as a promising biocontrol agent against this pathogen.

In this research, *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) strains were antagonistic against all three *Fusarium* species and produced *in vitro* all evaluated metabolites (indole-3-acetic acid production, lipolytic and proteolytic enzymes, siderophores, and mineral phosphate solubilization) (Table 3). The production of these metabolites has been shown to play an important role in the biocontrol of phytopathogenic fungi and promotion of plant growth (Sagar *et al.*, 2022). Proteolytic and lipolytic enzymes produced by *Bacillus* and *Pseudomonas* species cause cellular lysis of fungi; siderophores are antimicrobial compounds that facilitate iron mobilization and solubilization of nutrients not available to plants (Admassie *et al.*, 2022). The production of plant growth regulators such as indole-3-acetic acid stimulates the development of the plant root system and induces resistance to pathogens; while mineral solubilization such as phosphorus promotes plant development, induces resistance to pathogens, and improves water and nutrient uptake (Mahapatra *et al.*, 2022; Sagar *et al.*, 2022).

The ability of *Bacillus* and *Pseudomonas* species to produce a wide range of secondary metabolites encoded by various gene clusters has been suggested to result in disease suppression, growth promotion, and induction of resistance in plants (Andrić *et al.*, 2020; Dimkić *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022). However, it is important to note that the proportion of genes involved in the synthesis of antimicrobial compounds and other bioactive secondary metabolites varies depending on the

un amplio rango de plantas hospedantes (Baltrus *et al.*, 2017); sin embargo, se han identificado cepas de *P. syringae* no fitopatógenas cuyo genoma alberga un extenso grupo de genes relacionados con el biocontrol de fitopatógenos, promoción de crecimiento e inducción de resistencia en plantas (Passera *et al.*, 2019). Yu *et al.* (2017), demostraron que la cepa *Pseudomonas syringae* BAF.1 inhibió completamente la germinación de conidios y afectó la estructura del micelio de *Fusarium oxysporum* proponiéndolo como un promisorio agente de biocontrol contra este patógeno.

En esta investigación, las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) fueron antagonistas contra las tres especies de *Fusarium* y produjeron *in vitro* todos los metabolitos evaluados (producción de ácido indol-3-acético; enzimas lipolíticas y proteolíticas, sideróforos y solubilización de fosfato mineral) (Cuadro 3). Se ha evidenciado que la producción de estos metabolitos juega un papel importante en el biocontrol de hongos fitopatógenos y promoción del crecimiento de plantas (Sagar *et al.*, 2022). Las enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas por especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* causan lisis celular de hongos; los sideróforos son compuestos antimicrobianos que facilitan la movilización de hierro y solubilización de nutrientes no disponibles por las plantas (Admassie *et al.*, 2022). La producción de reguladores del crecimiento vegetal como el ácido indol-3-acético estimula el desarrollo del sistema radical de las plantas e inducen resistencia a patógenos; en tanto que la solubilización de minerales como el fósforo promueve el desarrollo de las plantas, inducen resistencia a patógenos y mejoran la absorción de agua y otros nutrientes (Mahapatra *et al.*, 2022; Sagar *et al.*, 2022).

Se ha sugerido que en especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, la supresión de enfermedades, promoción de crecimiento e inducción de resistencia

species and strain (Devi *et al.*, 2019). Therefore, prior to registering their 16S rRNA sequences in the NCBI GenBank, it is recommended to further investigate the genome characteristics of the three antagonistic strains identified in this research. Previous studies have shown that inoculation of *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. strains promotes growth and induces resistance in maize plants (Egamberdiyeva *et al.*, 2007).

Species of the genus *Bacillus* are promising biological control agents due to their genetic characteristics, high heat and desiccation resistance through the formation of endospores (Luo *et al.*, 2022). These strains are considered to be safe for human health, hence there are no restrictions on their use as biocontrol agents according to the United States Environmental Protection Agency (Dimkić *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2006). Additionally, commercial formulations of *P. syringae* are approved for the management of *Fusarium* spp. in post-harvest in the USA and Canada (Al-Mughrabi *et al.*, 2013). Therefore, the *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *B. amyloliquefaciens* (BA18) strains identified in this research, isolated from sclerotia of *C. gigantea* that were antagonistic *in vitro* against three *Fusarium* species causing corn ear rot, and multifunctional in the production of secondary metabolites, represent an important biotechnological resource for future investigations as biocontrol agents against this pathogen in corn cultivation in Mexico.

CONCLUSIONS

The findings of this study suggest that the sclerotia of *C. gigantea* contain varying densities of bacterial populations, with those from the Atlacomulco locality exhibiting the highest density. Among these bacterial populations are strains that

en plantas son resultado de su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios codificados por diversos grupos de genes (Andrić *et al.*, 2020; Dimkić *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022); sin embargo, se consigna que la proporción de estos genes en el genoma involucrada en la síntesis de compuestos antimicrobianos y otros metabolitos secundarios bioactivos dependen de la especie y la cepa (Devi *et al.*, 2019), por lo que se sugiere profundizar en el conocimiento sobre las características del genoma de estas tres cepas antagonistas identificadas en esta investigación, previo al registro de las secuencias 16S rRNA en el GenBank del NCBI. Se ha demostrado que la inoculación de cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. promueven el crecimiento e inducen la resistencia en plantas de maíz (Egamberdiyeva *et al.*, 2007).

Especies del género *Bacillus* son promisorios agentes de control biológico debido a sus características genéticas, alta resistencia al calor y desecación por la formación de endosporas (Luo *et al.*, 2022); se consideran cepas que no representan un riesgo a la salud humana por lo cual no hay restricciones para su uso como agentes de biocontrol de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de EUA (Dimkić *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2006). Así mismo, formulaciones comerciales de *P. syringae* están aprobadas para el manejo de *Fusarium* spp. en postcosecha en EUA y Canadá (Al-Mughrabi *et al.*, 2013). Por lo anterior, las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *B. amyloliquefaciens* (BA18) identificadas en esta investigación, aisladas de esclerocios de *C. gigantea* antagonistas *in vitro* contra tres especies de *Fusarium* causantes de pudrición en mazorca de maíz, multifuncionales en la producción de metabolitos secundarios, son un recurso biotecnológico importante para futuras investigaciones como agentes de biocontrol contra este patógeno en el cultivo de maíz en México.

exhibit antagonism against at least one species of *Fusarium*, known to cause corn ear rot and produce metabolites that may promote plant growth. Through sequencing of the 16S rRNA gene, *Bacillus* and *Pseudomonas* genera were identified as the most abundant antagonistic bacteria in *C. gigantea* sclerotia. *In vitro* experiments demonstrated that *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2), and *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) strains were effective antagonists against all three species of *Fusarium* evaluated, with *Fusarium graminearum* being the most susceptible. These results suggest that these strains may represent a viable option for biocontrol of *Fusarium* species in maize cultivation in Mexico.

ACKNOWLEDGMENTS

To the National Council for Science and Technology (CONACyT). To Dr. Dolores Briones Reyes from the Postgraduate Program in Genetic Resources and Productivity at the College of Postgraduates Montecillo campus for donating the *Fusarium* spp. strains used in this research.

CITED LITERATURE

- Abdullah MT, Ali NY and Suleman P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection* 27: 1354-1359. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.007>
- Admassie M, Woldehawariat Y and Alemu T. 2022. *In vitro* evaluation of extracellular enzyme activity and its biocontrol efficacy of bacterial isolates from pepper plants for the management of *Phytophthora capsici*. *BioMed Research International* 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6778352>
- Agurell SL, Ramstad E and Ullstrup AJ. 1963. The alkaloids of maize ergot. Part V of biogenetic studies in ergot; Part IV: *Svensk Farmaceutisk Tidskrift* 66(741). *Planta Medica* 11:392-398. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1100254>
- Al-Mughrabi KI, Vikram A, Peters RD, Howard RJ, Grant L, Barasubiye T and Jayasuriya KE. 2013. Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. *Biological Control* 64:315-322. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.011>

CONCLUSIONES

Los esclerocios de *C. gigantea* albergan diferente densidad de poblaciones bacterianas. En los esclerocios con origen en la localidad de Atlacomulco Estado de México hay mayor densidad bacteriana que en el resto de las localidades. Entre las poblaciones bacterianas que colonizan los esclerocios existen cepas antagonistas contra al menos una especie de *Fusarium* que causan pudrición de mazorca en maíz y producen diversos metabolitos posiblemente implicados con el antagonismo y promoción del crecimiento de plantas. De 22 cepas bacterianas antagonistas, la secuenciación parcial del gen 16S rRNA identificó a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* como las bacterias antagonistas más abundantes en esclerocios de *C. gigantea*. *Fusarium verticillioides* es menos sensible que *F. subglutinans* y *F. graminearum* al antagonismo *in vitro* de las cepas bacterianas aisladas de esclerocios de *C. gigantea*; *Fusarium graminearum* es la más sensible entre las tres especies de *Fusarium* evaluadas. Las cepas *Bacillus subtilis* (BA1), *Pseudomonas syringae* (BA2) y *Bacillus amyloliquefaciens* (BA18) son antagonistas *in vitro* eficientes contra las tres especies de *Fusarium* y una potencial alternativa para el biocontrol de estos patógenos en el cultivo de maíz en México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). A la Dra. Dolores Briones Reyes del Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados campus Montecillo por la donación de las cepas de *Fusarium* spp. utilizadas en esta investigación.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Andrić S, Meyer T and Ongena M. 2020. *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology* 11:1350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>
- Backhouse D and Stewart A. 1989. Interactions between *Bacillus* species and sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Soil Biology and Biochemistry* 21:173-176. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90029-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90029-1)
- Baker GC, Smith JJ and Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55:541-555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Baltrus DA, McCann HC and Guttman DS. 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 18:152-168. <https://doi.org/10.1111/mpp.12506>
- Bragg PE, Maust MD and Panaccione DG. 2017. Ergot alkaloid biosynthesis in the maize (*Zea mays*) ergot fungus *Claviceps gigantea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(49): 10703–10710. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04272>
- Cavaglieri L, Orlando JR, Rodriguez MI, Chulze S and Etcheverry M. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156:748-754. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.03.001>
- CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: Una Guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F. CIMMYT. 112 p.
- CIMMYT. 2019. Maíz para México. Plan Estratégico 2030. <https://repository.cimmyt.org/handle/10883/20219>
- Cochran WG. 1982. Técnicas de muestreo. Compañía Editorial Continental. México. 513 p.
- Coley-Smith JR and Dickinson DJ. 1971. Effects of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. on soil bacteria. The nature of substances exuded by sclerotia. *Soil Biology and Biochemistry* 3(1):27-32. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90028-9)
- Cui W, He P, Munir S, He P, Li X, Li Y, Wu J, Yang L, He P and He Y. 2019. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biological Control* 139:104080. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104080>
- de Ángel EC, Hernández-Castillo FD, Gallegos-Morales G, and Ochoa-Fuentes YM. 2021. Actividad antifúngica de bacterias endófitas para el control de *Fusarium verticillioides* en maíz. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 8(2): e2790. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2790>
- Devi S, Kiesewalter HT, Kovács R, Frisvad JC, Weber T, Larsen TO, Kovács AT and Ding L. 2019. Depiction of secondary metabolites and antifungal activity of *Bacillus velezensis* DTU001. *Synthetic and Systems Biotechnology* 4(3):142-149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2019.08.002>
- Dimkić I, Janakiev T, Petrović M, Degrassi G and Fira D. 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 117:101754. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- Egamberdiyeva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Applied Soil Ecology* 36:184–189. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.02.005>
- Elanchezhyan K, Keerthana U, Nagendran K, Prabhukarthikeyan SR, Prabakar K, Raguchander T and Karthikeyan G. 2018. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 103:92-101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.008>
- El-Yazeid AA, Abou-Aly HA, Mady MA and Moussa SAM. 2007. Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio phosphor) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3:274-286.
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J and Stanković S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285:44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fucikovský L and Moreno M. 1976. Distribution of *Claviceps gigantea* and its percent attack on two lines of corn in the state of México, México. *Plant Disease Reporter* 55:231-233.
- Fuentes SF, De la Isa ML, Ullstrup AJ and Rodríguez AE. 1964. *Claviceps gigantea*, a new pathogen of Maize in Mexico. *Phytopathology* 54(4):379-381.
- García-López V and Giraldo OF. 2021. Redes y estrategias para la defensa del maíz en México. *Revista Mexicana de Sociología* 83(2):297-329.
- Guzmán-Guzmán P and Santoyo G. 2022. Action mechanisms, biodiversity, and omics approaches in biocontrol and plant growth-promoting *Pseudomonas*: an updated review. *Biocontrol Science and Technology* 32(5):527–550. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2066630>
- Gilbert RG and Linderman RG. 1971. Increased activity of soil microorganisms near sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 17(4):557-562. <https://doi.org/10.1139/m71-091>
- Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, Lou Z, Huo R, Wu H, Borriss R and Gao X. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plantpathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied Environmental Microbiology* 83:e01075-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01075-17>

- Guimarães RA, Zanotto E, Perrony PEP, Zanotto LAS, da Silva LJ, Machado JDC and de Medeiros FHV. 2021. Integrating a chemical fungicide and *Bacillus subtilis* BIOUFLA2 ensures leaf protection and reduces ear rot (*Fusarium verticillioides*) and fumonisin content in maize. *Journal of Phytopathology* 169(3):139-148. <https://doi.org/10.1111/jph.12968>
- Hantsis-Zacharov E and Halpern M. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22):7162-7168. <https://doi.org/10.1128/aem.00866-07>
- Hof H. 2020. The medical relevance of *Fusarium* spp. *Journal of Fungi* 6(3): 117. <https://doi.org/10.3390/jof6030117>
- Hou X, Boyetchko SM, Brkic M, Olson D, Ross A and Hegedus D. 2006. Characterization of the anti-fungal activity of a *Bacillus* spp. associated with sclerotia from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(4):644-653. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0315-8>
- Liu Y, Lu J, Sun J, Lu F, Bie X and Lu Z. 2019. Membrane disruption and DNA binding of *Fusarium graminearum* cell induced by C16-Fengycin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Food Control* 102:206-213. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.031>
- Luo L, Zhao C, Wang E, Raza A and Yin C. 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research* 259:127016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- Mahapatra S, Yadav R and Ramakrishna W. 2022. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology* 132(5): 3543-3562. <https://doi.org/10.1111/jam.15480>
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez J, Buckler E and Doebley J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(9):6080-6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Mesterhazy A, Lemmens M and Reid LM. 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize—a review. *Plant Breeding* 131(1):1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01936.x>
- Mielniczuk E and Skwaryło-Bednarz B. 2020. *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy* 10(4):509. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040509>
- Moreno-Limón S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila ML and Perales-Ramírez A. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica* 32:193-205. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.12>
- Padrón HYM, Delgado SH, Méndez CAR and Carrillo GV. 2013. El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(2): 126-146.
- Panpatte DG, Jhala YK, Shelat HN and Vyas RV. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In: Singh, D., Singh, H., Prabha, R. (eds) *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity* (pp. 257-270). Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_15)
- Passera A, Compant S, Casati P, Maturo MG, Battelli G, Quaglino F, Antonielli L, Salerno D, Brasca M, Toffolatti SL, Mantegazza F, Delledonne M and Mitter B. 2019. Not Just a Pathogen? Description of a Plant-Beneficial *Pseudomonas syringae* Strain. *Frontiers in Microbiology* 10:1409. doi: 10.3389/fmicb.2019.01409
- Peng S, Zhou Q, Cai Z and Zhang Z. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials* 168(2-3):1490-1496. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.036>
- Proca IG, Diguță CF, Cornea CP, Jurcoane S and Matei F. 2020. Halotolerant *Bacillus amyloliquefaciens* 24.5. *Rom Biotechnology Letters* 25(4):1744-1753.
- Sagar A, Yadav SS, Sayyed RZ, Sharma S and Ramteke PW. 2022. *Bacillus subtilis*: a multifarious plant growth promoter, biocontrol agent, and bioalleviator of abiotic stress. In *Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting* (pp. 561-580). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85465-2_24)
- Schwyn B, and Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160(1):47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Singh P, Singh RK, Zhou Y, Wanga J, Jiangb Y, Shena N, Wanga Y, Yangb L and Mingguo J. 2022. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. *Journal of Plant Interactions* 17(1):220–238. <https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>
- Solano-Báez AR, Cuca-García JM, Delgado-Alvarado A, Panaccione D, De León-García de Alba C, Leyva-Mir SG, Sánchez-Pale JR and Hernández-Morales J. 2018. Biological activity of *Claviceps gigantea* in juvenile New Zealand rabbits. *Mycotoxin Research* 34:297-305. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0324-3>
- Tian D, Song X, Li C, Zhou W, Qin L, Wei L, Di W, Huang S, Li B, Huang Q, Long S, Hew Z and Wei S. 2021. Antifungal mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GKT04 against *Fusarium* wilt revealed using genomic and transcriptomic analyses. *Microbiology Open* 10(3):e1192. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1192>

- Ullstrup AJ. 1973. Maize ergot: a disease with a restricted ecological niche. PANS Pest Articles & News Summaries 19(3):389-391. <https://doi.org/10.1080/09670877309412786>
- Ursan MD, Boiu-Sicuia OA and Cornea CP. 2019. *Bacillus amyloliquefaciens* strains with biocontrol potential against *Fusarium* spp. wheat pathogens. Scientific Papers. Series A. Agronomy: 486-491. <https://doi.org/10.2478/alife-2018-0093>
- Utkhede RS and Rahe JE. 1980. Biological control of onion white rot. Soil Biology and Biochemistry 12(2):101-104. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(80\)90043-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90043-7)
- Wang S, Sun L, Zhang W, Chi F, Hao X, Bian J and Li Y. 2020. *Bacillus velezensis* BM21, a potential and efficient biocontrol agent in control of corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*. Egyptian Journal of Biological Pest Control 30(1):1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0209-6>
- Wong WC and Hughes IK. 1986. *Sclerotium cepivorum* Berk. in onion (*Allium cepa* L.) crops: isolation and characterization of bacteria antagonistic to the fungus in Queensland. Journal of Applied Bacteriology 60(1):57-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01065.x>
- Xu S, Wang Y, Hu J, Chen X, Qiu Y., Shi J, Wang G and Xu J. 2021. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01, a bifunctional biocontrol bacterium with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* and biodegradation capacity of zearalenone. Food Control 130:108259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108259>
- Yu C, Liu X, Zhang X, Zhang M, Gu Y, Ali Q, Mohamed MSR, Xu J, Shi J, Gao X, Wu H and Gu Q. 2021. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. Toxins 13(11):791. <https://doi.org/10.3390/toxins13110791>
- Yu S, Teng C, Liang J, Song T, Dong L, Bai, X Jin Y and Qu J. 2017. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. Journal Microbiology 55:877-884. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z>
- Zachow C, Grosch R and Berg G. 2011. Impact of biotic and a-biotic parameters on structure and function of microbial communities living on sclerotia of the soil-borne pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Applied Soil Ecology 48(2):193-200. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.03.006>
- Zenteno-Zevada M, 1963. Estudios sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. III. Pruebas de inoculación en plántulas de maíz con *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. In Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México 34: 69-83. <https://doi.org/10.21829/fb.289.2000.82>
- Zhao P, Quan C, Wang Y, Wang J and Fan S. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. Journal of Basic Microbiology 54(5):448-456. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200414>