

Activity of rhizobacteria of *Jatropha curcas* against *Fusarium verticillioides* and *Leptoglossus zonatus*

Actividad de rizobacterias de *Jatropha curcas* contra *Fusarium verticillioides* y *Leptoglossus zonatus*

Héctor Hernández-Guerra; Víctor R. Castrejón-Gómez; Miguel G. Velázquez-del Valle; Rodolfo Figueroa-Brito; Federico Castrejón-Ayala; Ana N. Hernández-Lauzardo*.

Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Interacciones Planta-Insecto, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yauatepec-Jojutla km 6, calle CEPROBI núm. 8, col. San Isidro. C. P. 62731, Apartado Postal 24. Yauatepec, Morelos, México.

anhernandez@ipn.mx Tel.: +52 (55) 57296000 ext. 82511 (*Corresponding author).

Abstract

The center of origin and domestication of *Jatropha curcas* L. is Mexico. This crop can be affected by several phytopathogenic fungi and insect pests that diminish the quality of the seeds. The aim of this study was to evaluate the antagonistic and entomopathogenic activity of rhizospheric bacteria (*B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*) against *Fusarium verticillioides* and *Leptoglossus zonatus*. The antagonistic activity of rhizobacteria was evaluated against *F. verticillioides* by dual culture technique on potato dextrose agar. Moreover, the effect of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* was evaluated on the mortality and development of *L. zonatus*. The results demonstrated that rhizobacteria inhibited the mycelial growth (26 to 55 %) and affected the hyphal morphology of *F. verticillioides* regardless of the culture medium and cultivation time tested. *B. mojavensis* (40.4 to 54 %), *L. sphaericus* (39.6 to 55 %) and *B. subtilis* (38.5 to 50%) caused the highest percentages of inhibition. On the other hand, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* showed no entomopathogenic activity because they did not affect the mortality or development of *L. zonatus*.

Keywords: Antagonistic activity, entomopathogenic activity, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus*.

Resumen

El centro de origen y domesticación de *Jatropha curcas* L. es México. Este cultivo puede ser afectado por diversos hongos fitopatógenos y plagas insectiles que disminuyen la calidad de las semillas. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antagonista y entomopatógena de bacterias rizosféricas (*Bacillus subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *Lysinibacillus sphaericus*) contra *Fusarium verticillioides* y *Leptoglossus zonatus*. La actividad antagonista de las rizobacterias se evaluó contra *F. verticillioides* mediante la técnica de cultivo dual en papa dextrosa agar. Además, se evaluó el efecto de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* en la mortalidad y desarrollo de *L. zonatus*. Los resultados demostraron que las rizobacterias inhibieron el crecimiento micelial (26 a 55 %) y afectaron la morfología hifal de *F. verticillioides* con independencia del medio y tiempo de cultivo probados. Los mayores porcentajes de inhibición lo causaron *B. mojavensis* (40.4 a 54 %), *L. sphaericus* (39.6 a 55 %) y *B. subtilis* (38.5 a 50 %). Por otra parte, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* no mostraron actividad entomopatógena, pues no afectaron la mortalidad ni el desarrollo de *L. zonatus*.

Palabras clave: Actividad antagonista, actividad entomopatógena, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus*.

Introduction

Jatropha curcas L. is a plant that belongs to the family Euphorbiaceae; Mexico is the center of origin and domestication (Dias, Missio, & Dias, 2012). *J. curcas* plantations are distributed in tropical regions of America, Africa and Asia. In recent years, the species has become more important because of its potential for producing biodiesel (Basili & Fontini, 2012); reforestation of less fertile tropical soils (Fresnedo-Ramírez & Orozco-Ramírez, 2013); establishment of extensive plantations in warm coastal, dry and marginal areas, to capture atmospheric CO₂ and climate change mitigation (Becker, Wulfmeyer, Berger, Gebel, & Münch, 2013); and recovery of degraded soils (Van Rooijen, 2014; Wani et al., 2012).

Terren et al. (2012) evidenced that roots, stems, branches, leaves, flowers, fruits and seeds of *J. curcas* are affected by insects and fungi that cause phytosanitary problems. Several species of insects belonging to the order Hemiptera cause damages in *J. curcas*. In particular, *L. zonatus* (Dallas) is one of the most damaging insects because it causes fruit abortion; reduces the size, weight and oil content in seeds; and leads to the formation of empty grains (Grimm & Somarriba, 1999, Terren et al., 2012). *L. zonatus* have been found in plantations the state of Morelos as a damage potential agent for the cultivation of *J. curcas*, because besides of causing damaging effects to the fruits, these insects also generate wounds that facilitate the entry of pathogenic fungi (Tepole-García, Pineda-Guillermo, Martínez-Herrera, & Castrejón-Gómez, 2012). These fungi alter the viability and quality of *J. curcas* seeds, specifically, *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg affects *J. curcas* seed decreasing the amount of lipids, free fatty acid content and seeds viability (Dharmaputra, Worang, Syarief, & Tahudin, 2009), so it is necessary to address phytosanitary affectations taking into account the importance of the crop. An ecology alternative is the use of antagonistic bacteria from the rhizosphere with potential for biological control of pests and diseases.

Rhizospheric bacteria produce protein crystals that affect different insects and metabolites, lytic enzymes that inhibit the development of pathogenic fungi. However, the rhizosphere of *J. curcas* has been little studied, because there are few studies that address the use of antagonists bacteria obtained for controlling phytopathogenic fungi (Latha et al., 2011) and there are no previous reports on the use against crop insect pests. In this context, the aim of this work was to evaluate the antagonistic and entomopathogenic activity of rhizospheric bacteria of *J. curcas* against *F. verticillioides* and *L. zonatus*.

Introducción

Jatropha curcas L. es una planta de la familia Euphorbiaceae; el centro de origen y domesticación es México (Dias, Missio, & Dias, 2012). Las plantaciones de *J. curcas* se distribuyen en las regiones tropicales de América, África y Asia. En los últimos años, la especie ha tenido mayor atención debido a su potencial para la producción de biodiesel (Basili & Fontini, 2012); reforestación de suelos tropicales poco fértiles (Fresnedo-Ramírez & Orozco-Ramírez, 2013); establecimiento de plantaciones extensas en zonas costeras cálidas, secas y marginales, para la captura de CO₂ atmosférico y mitigación del cambio climático (Becker, Wulfmeyer, Berger, Gebel, & Münch, 2013); y recuperación de suelos degradados (Van Rooijen, 2014; Wani et al., 2012).

Terren et al. (2012) evidenciaron que las raíces, tallos, ramas, hojas, flores, frutos y semillas de *J. curcas* son afectados por insectos y hongos que causan problemas fitosanitarios. Diversas especies de insectos pertenecientes a la orden Hemiptera causan afectaciones en *J. curcas*. En particular, *L. zonatus* (Dallas) es una de las más dañinas pues provoca aborto de los frutos; reduce el tamaño, peso y contenido de aceite en semillas; y conlleva a la formación de granos vacíos (Grimm & Somarriba, 1999, Terren et al., 2012). *L. zonatus* se ha encontrado en plantaciones del estado de Morelos como un agente potencial de daño para el cultivo de *J. curcas*, porque además de causar efectos perjudiciales a los frutos, también forma heridas que facilitan la entrada de hongos fitopatógenos (Tepole-García, Pineda-Guillermo, Martínez-Herrera, & Castrejón-Gómez, 2012). Estos hongos alteran la viabilidad y calidad de semillas de *J. curcas*, en específico, *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg afecta la semilla de *J. curcas* disminuyendo la cantidad de lípidos, contenido de ácidos grasos libres y la viabilidad de las semillas (Dharmaputra, Worang, Syarief, & Tahudin, 2009), por lo que es necesario atender las afectaciones fitosanitarias teniendo en cuenta la importancia del cultivo. Una alternativa ecológica es el uso de bacterias antagonistas provenientes de la rizósfera con potencial de control biológico de plagas y enfermedades.

Las bacterias rizosféricas producen cristales proteicos que afectan a diferentes insectos y metabolitos, enzimas líticas que inhiben el desarrollo de hongos fitopatógenos. A pesar de ello, la rizósfera de *J. curcas* ha sido poco estudiada, pues son escasos los trabajos que abordan el uso de bacterias antagonistas obtenidas para controlar hongos fitopatógenos (Latha et al., 2011) y no hay reportes previos del uso contra insectos plaga del cultivo. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antagonista

Materials and methods

Biological material

Microbial strains. The strains used in this study belong to the Laboratory of Phytopathology at Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI-IPN). *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *B. mojavensis* Roberts, Nakamura & Cohan, *B. thuringiensis* Berliner and *L. sphaericus* comb. nov. were isolated from rhizospheric soil of *J. curcas*, and *F. verticillioides*, from crop seeds. The bacteria were cultured on nutrient agar and stored at 4 °C and the fungus on potato dextrose agar at 28 °C.

Insects. The nymphs of *L. zonatus* were obtained from a colony maintained at 25 °C with 60 % relative humidity and photoperiod of 12:12 at the Laboratory of Chemical Ecology at CEPROBI-IPN. Parents were collected in 2012 in a sorghum crop located in Diego Ruíz, Yauatepec, Morelos (18° 49' 22.85" N and 99° 06' 13.68" W) and an experimental plantation of *J. curcas* located at CEPROBI-IPN. The insects were identified based on McPherson, Packauskas, Taylor, and O'Brien (1990) keys.

Establishment the breeding of *L. zonatus*

Nymphs and adults of *L. zonatus* were placed in acrylic cages (27 x 23 cm) and took to the Laboratory of Chemical Ecology at CEPROBI-IPN. Nymphs and adults were fed with young pods of green beans and maize, and received water with honey at 10% using Eppendorf perforated tubes (1.5 mL) at the base; food was changed every third day. Post mating, insects were isolated to obtain the eggs, which were counted and separated until the emergence of nymphs. These were selected immature in the fourth and fifth nymphal stage for subsequent bioassays.

Bacterial growth kinetics

The bacterial inoculum (*B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus*) was obtained by a loopful of the strain that was placed in 50 mL of nutrient broth and incubated under agitation (150 rpm) at 28 °C for 12 h.

Kinetics in nutrient broth medium. An aliquot of 0.5 mL of inoculum of each bacterial strain was added to flasks containing 50 mL of nutrient broth. Cultures were incubated under stirring (150 rpm) at 28 °C for 36 h. Every 4 h samples of 1 mL of the bacterial culture were taken and the absorbance was measured at an optical density of 590 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-160, Japan). With the data obtained growth kinetics graphs were made using the SigmaPlot version 11.0 (Systat Software Inc., 2008).

y entomopatógena de bacterias rizosféricas de *J. curcas* contra *F. verticillioides* y *L. zonatus*.

Materiales y métodos

Material biológico

Cepas microbianas. Las cepas empleadas en este estudio pertenecen al Laboratorio de Fitopatología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI-IPN). *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *B. mojavensis* Roberts, Nakamura & Cohan, *B. thuringiensis* Berliner y *L. sphaericus* comb. nov. se aislaron de suelo rizosférico de *J. curcas*, y *F. verticillioides*, de semillas del cultivo. Las bacterias se sembraron en agar nutritivo y se conservaron a 4 °C, y el hongo en papa dextrosa agar a 28 °C.

Insectos. Las ninfas de *L. zonatus* se obtuvieron de una colonia mantenida a 25 °C con 60 % de humedad relativa y fotoperiodo de 12:12 en el Laboratorio de Ecología Química del CEPROBI-IPN. Los progenitores se colectaron en 2012 en un cultivo de sorgo ubicado en la colonia Diego Ruíz, municipio de Yauatepec, Morelos (18° 49' 22.85" N y 99° 06' 13.68" O) y en una plantación experimental de *J. curcas* ubicada en el CEPROBI-IPN. Los insectos se identificaron con base en las claves de McPherson, Packauskas, Taylor, y O'Brien (1990).

Establecimiento de la cría de *L. zonatus*

Las ninfas y adultos de *L. zonatus* se colocaron en jaulas de acrílico (27 x 23 cm) y se llevaron al Laboratorio de Ecología Química del CEPROBI-IPN. Las ninfas y adultos se alimentaron con vainas tiernas de ejote y elote, y se les suministró agua con miel al 10 % en tubos Eppendorf (1.5 mL) perforados en la base; el alimento se cambió cada tercer día. Posterior al apareamiento, los insectos se aislaron para la obtención de los huevecillos, los cuales se contaron y separaron hasta la emergencia de las ninfas. Éstas se seleccionaron en el cuarto y quinto estado ninfal para los bioensayos posteriores.

Cinéticas de crecimiento bacteriano

El inóculo bacteriano (*B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus*) se obtuvo mediante una asada de la cepa que se colocó en 50 mL de caldo nutritivo y se incubó en agitación (150 rpm) a 28 °C durante 12 h.

Cinética en medio caldo nutritivo. Una alícuota de 0.5 mL de inóculo de cada cepa bacteriana se añadió en matraces que contenían 50 mL de caldo nutritivo. Los cultivos se incubaron en agitación (150 rpm) a 28 °C durante 36 h. Cada 4 h se tomaron muestras de 1 mL del cultivo bacteriano y se midió la absorbancia a una densidad óptica de 590 nm en un espectrofotómetro

Kinetics in nutrient broth medium supplemented with yeast extract and salts (SNB). *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* were grown in SNB (nutrient broth plus 0.05 % yeast extract and salts solution) (Dussán, Andrade, Lush, & Vanegas, 2002). Samples were taken and processed as explained above to determine the growth phases.

Bioassays of *in vitro* antagonism

Antagonist activity of rhizospheric bacteria by dual culture. Antagonism tests were performed using the dual culture method in Petri dishes with nutrient agar. The rhizospheric bacteria *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus*, and the phytopathogenic fungus *F. verticillioides* were used. A loopful of bacterial culture (24 h) was inoculated into four equidistant points (1 cm²) of the Petri dish and mycelial disc (5 mm) of *F. verticillioides* was placed in the center. The control consisted only of a disc of 5 mm of the fungus in nutrient agar medium. The treatments were incubated at 28 °C until the mycelium of *F. verticillioides* (control) completely filled the Petri dish. Then, the diameter of mycelial growth was measured with a digital vernier for calculating the percent inhibition using the equation of Guo et al. (2006):

$$\text{Mycelial inhibition (\%)} = [1 - (D_a/D_b)] * 100$$

where:

D_a = Diameter of mycelial growth zone of treatments (mm)

D_b = Diameter of mycelial growth zone of the control (mm)

Antagonistic activity of rhizospheric bacteria grown in nutrient broth. From the kinetics of bacterial growth developed in nutrient broth, 5 µL from each bacterial strain grown for 12 and 24 h was taken and inoculated using the dual culture technique in four equidistant points of the Petri dishes with nutrient agar. Cultures were incubated at 28 °C until the mycelium of the control filled the Petri dish. Mycelial growth data and percent of inhibition were obtained as mentioned in the previous point.

Effect of rhizospheric bacteria in the hyphal morphology of *F. verticillioides*

A disc of 5 mm from the mycelial growth zone (*F. verticillioides*) inhibited by *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* was cut and placed on a microscope slide. Antagonism of rhizobacteria in dual culture in Petri dishes with nutrient agar was determined by blue staining cotton (0.5 g·100 mL⁻¹ of lactophenol). The mycelium of the control treatment was processed in the same way. Samples were coverslipped and viewed under a light microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) with 20X and 40X magnifications. The morphology of the fungal mycelium was described based on that observed.

(Shimadzu UV-160, Japón). Con los datos obtenidos se elaboraron las gráficas de cinética de crecimiento en SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software Inc., 2008).

Cinéticas en medio caldo nutritivo suplementado con extracto de levadura y sales (CNS). Las bacterias *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* se cultivaron en medio CNS (caldo nutritivo más extracto de levadura al 0.05 % y solución de sales) (Dussán, Andrade, Lozano, & Vanegas, 2002). Las muestras se tomaron y procesaron como se explicó anteriormente para determinar las fases de crecimiento.

Bioensayos de antagonismo *in vitro*

Actividad antagonista de bacterias rizosféricas mediante cultivo dual. Las pruebas de antagonismo se realizaron utilizando el método de cultivo dual en cajas Petri con agar nutritivo. Se emplearon las bacterias rizosféricas *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus*, y el hongo fitopatógeno *F. verticillioides*. Una asada de cultivo bacteriano (24 h) se inoculó en cuatro puntos equidistantes (1 cm²) de la caja Petri y en el centro se colocó un disco de micelio (5 mm) de *F. verticillioides*. El testigo constó solo de un disco de 5 mm del hongo en medio agar nutritivo. Los tratamientos se incubaron a 28 °C hasta que el micelio de *F. verticillioides* (testigo) llenó completamente la caja Petri. Posteriormente, el diámetro del crecimiento micelial se midió con un vernier digital para el cálculo del porcentaje de inhibición mediante la ecuación de Guo et al. (2006):

$$\text{Inhibición micelial (\%)} = [1 - (D_a/D_b)] * 100$$

donde:

D_a = Diámetro de la zona de crecimiento micelial de los tratamientos (mm)

D_b = Diámetro de la zona de crecimiento micelial del testigo (mm)

Actividad antagonista de bacterias rizosféricas crecidas en caldo nutritivo. A partir de las cinéticas de crecimiento bacteriano desarrolladas en caldo nutritivo, se tomaron 5 µL de cada cepa bacteriana cultivada durante 12 y 24 h y se inoculó mediante la técnica de cultivo dual en cuatro puntos equidistantes de las cajas Petri con agar nutritivo. Los cultivos se incubaron a 28 °C hasta que el micelio del testigo llenó la caja Petri. Los datos del crecimiento micelial y porcentaje de inhibición se obtuvieron de la forma mencionada en el punto anterior.

Efecto de bacterias rizosféricas en la morfología hifal de *F. verticillioides*

Un disco de 5 mm de la zona de crecimiento micelial (*F. verticillioides*) inhibido por *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* se cortó y se colocó en un

Mortality and weight reduction of *L. zonatus* insect by the effect of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* rhizobacteria

Before bioassays, immature nymphs of fourth stage were individually placed in plastic cups (No. 4) without food for 4 h. Then, an Eppendorf tube perforated at the base was placed in each cup for feeding nymphs. A total of 1 mL of the appropriate bacteria (*B. thuringiensis* or *L. sphaericus*), grown in SNB medium for 16 h, was placed in the tube; in addition, two tender corn kernels that were changed every other day were placed. A total of 1 mL of nutrient broth without bacteria was added with the control nymphs. Each treatment was integrated with 30 nymphs. It is important to mention that *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* bacteria were evaluated based on the insecticidal activity demonstrated in previous studies (Baum et al., 2012; Berry et al., 2012). The mortality assessment was performed every 24 h for five days after the start of the experiment. Preliminary observations allowed determining that the duration of the fourth nymphal stage was five days. Dead insects were removed at each observation and mortality was calculated at end of the experiment according to the formula of Abbott (1925):

$$\text{Mortality (\%)} = 100 \left[\frac{\text{dead insects treated (\%)} - \text{control dead insects (\%)}}{100 - \text{control dead insects (\%)}} \right]$$

Moreover, weight data of fourth and fifth nymphal stage of *L. zonatus* were collected; in addition, it was observed whether any morphological change or delay occurred in the life cycle.

Data analysis

Experiments were performed in triplicate using a complete randomized design with simple arrangement. Data from *in vitro* antagonism and nymphal weight were processed by one-way analysis of variance and means were compared by the method of Holm-Sidak ($P = 0.05$). The effect of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* on mortality of *L. zonatus* was analyzed using the Chi-square test (χ^2) using the SigmaPlot version 11.0 statistical software (Systat Software Inc., 2008).

Results and discussion

Bacterial growth kinetics in two culture media

Growth kinetics of *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* rhizobacteria in nutritive broth and SNB are shown in Figure 1. All bacteria had the four phases of typical bacterial growth in a maximum of 36 h: adaptation (0-6 h), exponential (6-12 h), stationary (12-24 h) and decline (from 24 h onwards). The phases were reflected equally in nutrient broth medium

portaobjetos. El antagonismo de las rizobacterias en cultivo dual en cajas Petri con agar nutritivo se determinó mediante una tinción con azul de algodón (0.5 g·100 mL⁻¹ de lactofenol). El micelio del tratamiento testigo se procesó de la misma forma. Las muestras se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse 80i, Japón) con aumentos de 20X y 40X. La morfología del micelio fúngico se describió con base en lo observado.

Mortalidad y reducción del peso del insecto *L. zonatus* por efecto de las rizobacterias *B. thuringiensis* y *L. sphaericus*

Previo a los bioensayos, las ninfas del cuarto estadio se colocaron individualmente en vasos de plástico (número 4) sin alimento por 4 h. Posteriormente, un tubo Eppendorf perforado en la base se colocó dentro de cada vaso para la alimentación de las ninfas. En el tubo se depositó 1 mL de la bacteria correspondiente (*B. thuringiensis* o *L. sphaericus*), crecida en medio CNS durante 16 h; adicionalmente, se colocaron dos granos tiernos de elote que se cambiaron cada dos días. En las ninfas testigo se colocó 1 mL de caldo nutritivo sin la bacteria. Cada tratamiento se integró con 30 ninfas. Cabe mencionar que las bacterias *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* se evaluaron con base en la actividad insecticida demostrada en trabajos previos (Baum et al., 2012; Berry et al., 2012). La evaluación de la mortalidad se realizó cada 24 h durante los cinco días posteriores del inicio del experimento. Las observaciones preliminares permitieron determinar que la duración del cuarto estado ninfal fue de cinco días. Los insectos muertos fueron removidos en cada observación y al final del experimento la tasa de mortalidad se calculó de acuerdo con la fórmula de Abbott (1925):

$$\text{Mortalidad (\%)} = 100 \left[\frac{\text{muertos tratados (\%)} - \text{muertos control (\%)}}{100 - \text{muertos control (\%)}} \right]$$

Por otra parte, se tomaron datos de peso del cuarto y quinto estado ninfal de *L. zonatus*; además, se observó si ocurrió algún cambio morfológico o retraso en el ciclo biológico.

Análisis de datos

Los experimentos se realizaron por triplicado mediante un diseño completamente al azar con arreglo simple. Los datos del antagonismo *in vitro* y del peso ninfal se procesaron mediante análisis de varianza de una vía y las medias se compararon por el método Holm-Sidak ($P = 0.05$). El efecto de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* sobre la mortalidad de *L. zonatus* se analizó usando la prueba Chi-cuadrada (χ^2) con el programa estadístico SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software Inc., 2008).

and SNB. The production of metabolites related and not related to bacterial growth plays a critical role in the antagonistic activity. Moreover, the use of a supplemented medium could facilitate the formation of toxins with entomopathogenic activity (Dussán et al., 2002). By means of staining using crystal violet we observed a large amount of protein crystals in *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* strains. These results agree with those reported by Poopathi et al. (2014), who found entomopathogenic activity of *Bacillus cereus* Frankland & Frankland against mosquitoes with high protein production from 12 hours of culture in *Luria Bertani* medium.

In vitro antagonist activity of rhizobacteria on *F. verticillioides*

The antagonist activity of *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* to mycelial growth of *F. verticillioides* is reported in Table 1. All rhizobacteria inhibited the mycelial growth of *F. verticillioides* in nutrient agar medium regardless of the method of cultivation used for multiplication and antagonists metabolites released in liquid medium for 12 and 24 h.

Resultados y discusión

Cinéticas de crecimiento bacteriano en dos medios de cultivo

Las cinéticas de crecimiento de las rizobacterias *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* en medio caldo nutritivo y CNS se muestran en la Figura 1. Todas las bacterias presentaron las cuatro fases de crecimiento bacteriano típicas en un máximo de 36 h: adaptación (0-6 h), exponencial (6-12 h), estacionaria (12-24 h) y declinación (de 24 h en adelante). Las fases se reflejaron por igual en medio caldo nutritivo y CNS. La producción de metabolitos asociados o no al crecimiento bacteriano desempeña un papel fundamental en la actividad antagonista. Por otra parte, el uso de un medio suplementado podría facilitar la formación de toxinas con actividad entomopatógena (Dussán et al., 2002). Mediante tinciones realizadas con cristal violeta se observó gran cantidad de cristales proteicos en las cepas de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus*. Estos resultados coinciden con los reportados por Poopathi et al. (2014), quienes encontraron actividad entomopatógena de *Bacillus cereus* Frankland & Frankland contra mosquitos,

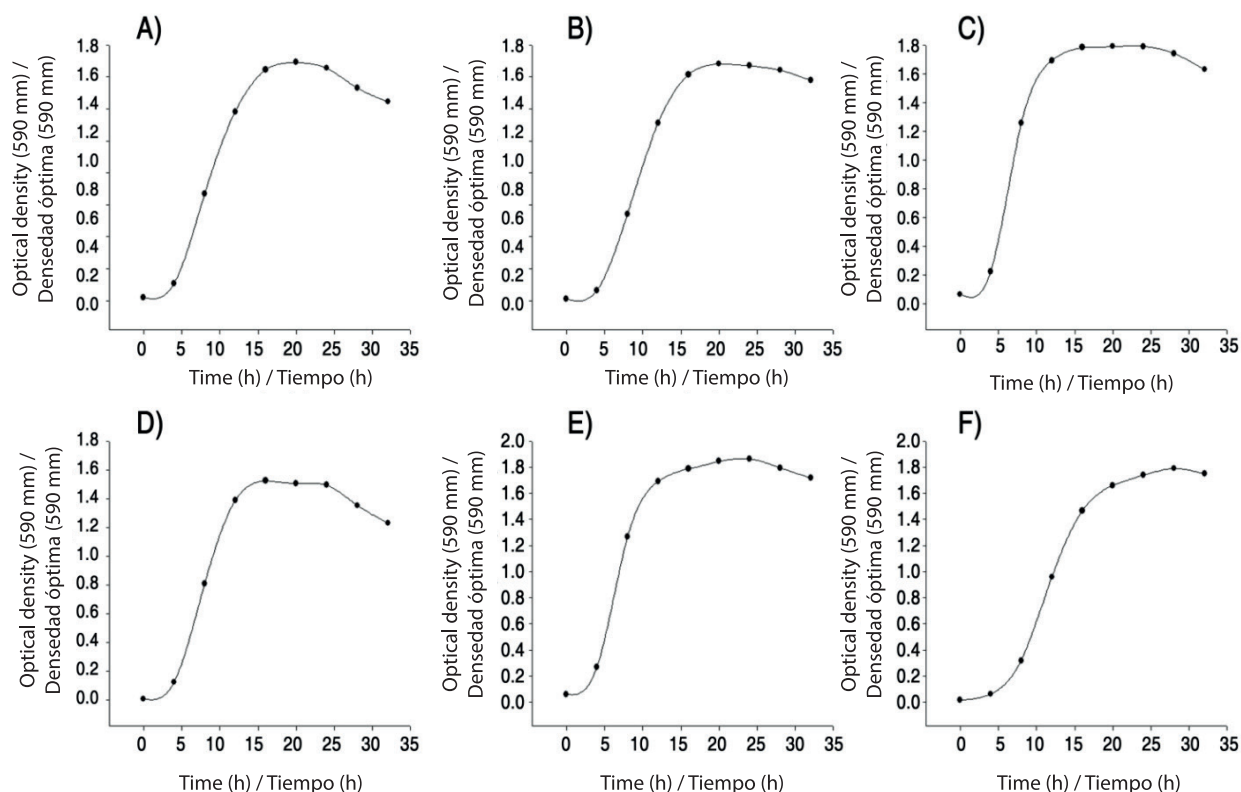


Figure 1. Growth kinetics of rhizospheric bacteria in nutrient broth (NB) and supplemented nutrient broth (SNB) at 28 °C in agitation (150 rpm) for 36 h. A) *B. subtilis* (NB), B) *B. mojavensis* (NB), C) *B. thuringiensis* (NB), D) *L. sphaericus* (NB), E) *B. thuringiensis* (SNB), F) *L. sphaericus* (SNB).

Figura 1. Cinética de crecimiento de las bacterias rizosféricas en caldo nutritivo (CN) y caldo nutritivo suplementado (CNS) a 28 °C en agitación (150 rpm) durante 36 h. A) *B. subtilis* (CN), B) *B. mojavensis* (CN), C) *B. thuringiensis* (CN), D) *L. sphaericus* (CN), E) *B. thuringiensis* (CNS), F) *L. sphaericus* (CNS).

Table 1. *In vitro* antifungal effect of *Jatropha curcas* rhizospheric bacteria on mycelial growth of *Fusarium verticillioides* at 28 °C.

Cuadro 1. Efecto antifúngico *in vitro* de las bacterias rizosféricas de *Jatropha curcas* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides*, a 28 °C.

Treatments/ Tratamientos	Nutrient agar (7 days)/ Agar nutritivo (7 días)		Nutrient broth (12 h)/ Caldo nutritivo (12 h)		Nutrient broth (24 h)/ Caldo nutritivo (24 h)	
	MG (mm)/ CM (mm)	IMG (%)/ ICM (%)	MG (mm)/ CM (mm)	IMG (%)/ ICM (%)	MG (mm)/ CM (mm)	IMG (%)/ ICM (%)
Control/Testigo	85.31 ± 0.54 a	0	85.43 ± 0.74 a	0	85.43 ± 0.74 a	0
<i>Bacillus subtilis</i>	43.04 ± 3.46 c	50.0	52.57 ± 2.46 c	38.5	47.68 ± 3.57 c	44.2
<i>Bacillus mojavensis</i>	39.89 ± 1.74 c	54.0	50.92 ± 2.48 c	40.4	48.78 ± 4.58 c	43.0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	63.98 ± 3.71 b	26.0	62.03 ± 7.04 b	27.4	61.18 ± 3.15 b	28.4
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	38.79 ± 4.68 c	55.0	51.67 ± 4.11 c	39.6	50.08 ± 2.90 c	41.4

MG: Mycelial growth. IMG: Inhibition of mycelial growth. One-way ANOVA. Same letters in the same column indicate no statistically significant differences according to the method Holm-Sidak ($P = 0.05$).

CM: Crecimiento micelial. ICM: Inhibición del crecimiento micelial. ANOVA de una vía. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el método Holm-Sidak ($P = 0.05$).

The highest percentages of inhibition were caused by *B. subtilis* (38.5 to 50 %), *B. mojavensis* (40.4 to 54 %) and *L. sphaericus* (39.6 to 55 %); statistically significant differences ($P = 0.05$) were observed between the mycelial growth of the control and that obtained with rhizospheric bacteria.

Colonial morphology of *F. verticillioides* is shown in Figure 2. The control had radially whitish mycelial growth, cottony texture and regular edges (Figure 2A). The presence of *B. subtilis* caused that *F. verticillioides* had square shaped delayed mycelial growth (Figures 2B, 2C and 2D). Latha et al. (2011) isolated *B. subtilis* from the rhizosphere of *J. curcas* and showed that the bacteria inhibited the phytopathogenic fungus *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon & Maublanc under field conditions.

In this study, treatments with *B. mojavensis* caused major morphological damages in the mycelium of *F. verticillioides*; additionally, the bacteria induced fungal colonies with white and cottony central part (Figure 2E). Other morphological changes are highlighted in the development of irregular square fungal colonies (Figure 2F, 2G). It has been reported that *B. mojavensis* produced proteases, siderophores and volatile compounds inhibiting the mycelial growth of *F. verticillioides* (Bacon & Hinton, 2002; Bacon, Hinton, Mitchell, Snook, & Olubajo, 2012). The rhizobacteria *B. mojavensis* has a complex antagonist mechanism not yet fully known, where in addition to producing the above compounds also relates the production of surfactins with antifungal activity (Bacon et al., 2012).

con una producción elevada de proteínas a partir de las 12 h de cultivo en medio Luria Bertani.

Actividad antagonista *in vitro* de las rizobacterias sobre *F. verticillioides*

La actividad antagonista de *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* ante el crecimiento micelial de *F. verticillioides* se reporta en el Cuadro 1. Todas las rizobacterias inhibieron el crecimiento micelial de *F. verticillioides* en medio agar nutritivo con independencia del método de cultivo utilizado para su multiplicación y de los metabolitos antagonistas liberados en medio líquido durante 12 y 24 h. Los mayores porcentajes de inhibición lo causaron *B. subtilis* (38.5 a 50 %), *B. mojavensis* (40.4 a 54 %) y *L. sphaericus* (39.6 a 55 %); se observaron diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$) entre el crecimiento micelial del testigo y el obtenido con las bacterias rizosféricas.

La morfología colonial de *F. verticillioides* se observa en la Figura 2. El testigo presentó crecimiento micelial en forma radial de color blanquecino, textura algodonosa y bordes regulares (Figura 2A). La presencia de *B. subtilis* provocó que *F. verticillioides* presentara crecimiento micelial retardado y en forma cuadrada (Figuras 2B, 2C y 2D). Latha et al. (2011) aislaron *B. subtilis* de la rizósfera de *J. curcas* y demostraron que la bacteria inhibió al hongo fitopatogénico *Lasiodiplodia theobromae* (Patouillard) Griffon & Maublanc en condiciones de campo.

En este trabajo, los tratamientos con *B. mojavensis* provocaron las mayores afectaciones morfológicas en

Bacillus thuringiensis treatments induced minor changes in color and appearance of *F. verticillioides* mycelium, but the mycelial growth of the fungus had also a square shape (Figures 2H, 2I and 2J). Recently, Rocha et al. (2014) demonstrated in *in vitro* tests that *B. thuringiensis* suppresses growth and inhibits the production of fumonisin of *F. verticillioides*, which concluded that the bacteria in addition to its ability to control insect

el micelio de *F. verticillioides*; adicionalmente, la bacteria indujo colonias fúngicas con la parte central más blanca y algodonosa (Figura 2E). Otros cambios morfológicos se destacan en el desarrollo de colonias fúngicas cuadradas irregulares (Figura 2F, 2G). Se ha reportado que *B. mojavensis* produce proteasas, sideróforos y compuestos volátiles que inhiben el crecimiento micelial de *F. verticillioides* (Bacon & Hinton, 2002; Bacon, Hinton,

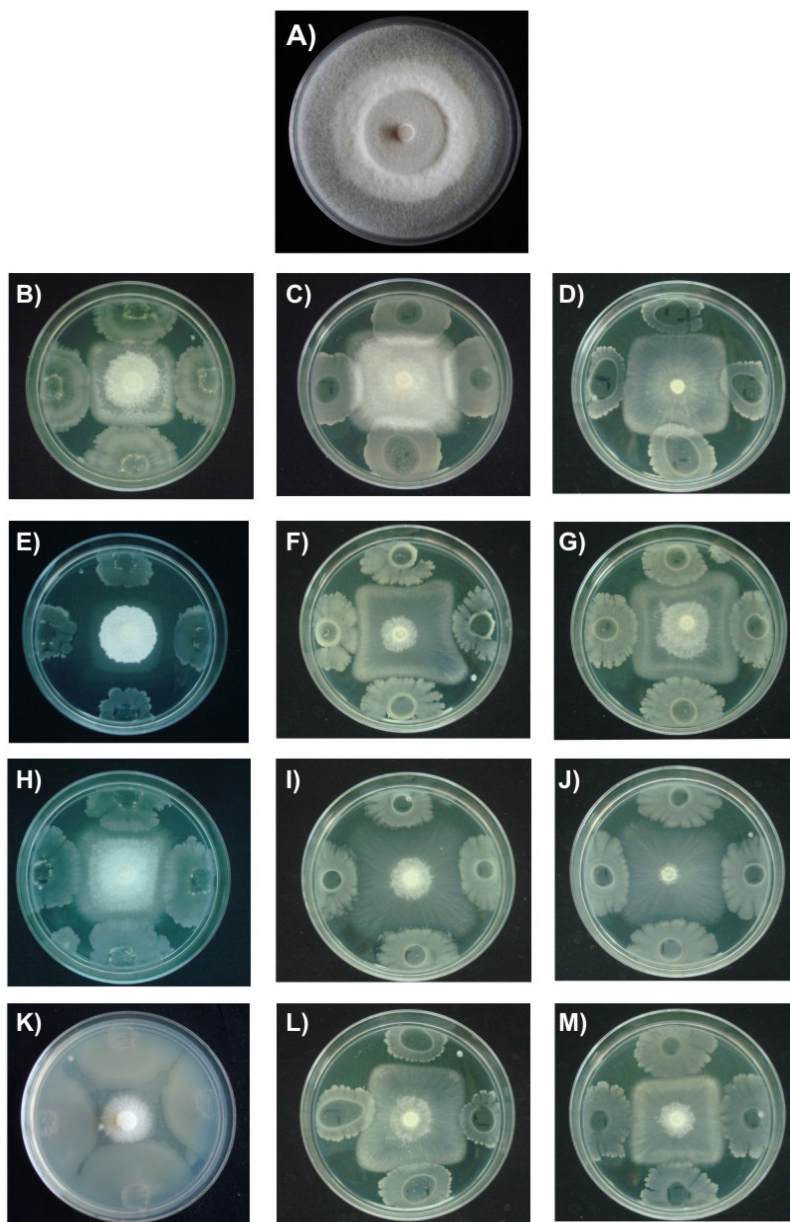


Figure 2. Effect of rhizospheric bacteria in the mycelial growth of *Fusarium verticillioides* on nutrient agar (NA) at 28 °C for seven days and nutrient broth (NB) for 12 and 24 h. A) Control, B) *B. subtilis* (NA); C) *B. subtilis* (NB 12 h); D) *B. subtilis* (NB, 24 h); E) *B. mojavensis* (NA); F) *B. mojavensis* (NB, 12 h); G) *B. mojavensis* (NB, 24 h); H) *B. thuringiensis* (NA); I) *B. thuringiensis* (NB, 12 h); J) *B. thuringiensis* (NB, 24 h); K) *L. sphaericus* (NA); L) *L. sphaericus* (NB 12 h); M) *L. sphaericus* (24 h).

Figura 2. Efecto de bacterias rizosféricas en el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides* en agar nutritivo (AN) a 28 °C durante siete días y en caldo nutritivo (CN) por 12 y 24 h. A) Control, B) *B. subtilis* (AN); C) *B. subtilis* (CN, 12 h); D) *B. subtilis* (CN, 24 h); E) *B. mojavensis* (AN); F) *B. mojavensis* (CN, 12 h); G) *B. mojavensis* (CN, 24 h); H) *B. thuringiensis* (AN); I) *B. thuringiensis* (CN, 12 h); J) *B. thuringiensis* (CN, 24 h); K) *L. sphaericus* (AN); L) *L. sphaericus* (CN, 12 h); M) *L. sphaericus* (24 h).

pests, has potential as a biological control agent of phytopathogenic fungi. Moreover, *L. sphaericus* showed rapid growth and high inhibitory activity when grown dually with *F. verticillioides* (Figure 2K). A recent study showed a high activity of *Lysinibacillus* sp. against various bacteria and fungi (Ahmad, Iqbal, Haseeb, & Khan, 2014); antimicrobial activity was attributed to bacteriocins, suggesting that this bacteria is an alternative to control microbial deterioration of foodstuffs.

In general, rhizobacteria are very diverse and may have potential as biocontrol agents based on their antagonistic activity, highlighting the species of the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, which can inhibit the growth of phytopathogens such as *Fusarium oxysporum* Schlechtendal, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium* spp. (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012). In particular, in the rhizosphere of *J. curcas* bacteria have been isolated from the genera *Enterobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* with the aim of promoting plant growth, but without evaluating the antifungal activity of these rhizobacteria (Jha, Patel, & Saraf, 2012; Patel & Saraf, 2013); therefore, the results obtained in this study are of interest for the management of fungal diseases of a crop.

Rhizobacteria effect on the morphology of hyphae of *F. verticillioides*

Figure 3 shows the hyphae of *F. verticillioides* treated with different rhizobacteria. At 7 and 14 days, the control presented rectilinear septate hyphae with uniform thickness and homogeneous cell content (Figures 3A and 3F). The rhizobacteria caused damages on hyphal morphology expressed in several ways. *B. subtilis* caused curvature and thickening provoking cell vacuolization at 14 days (Figures 3B and 3G); *B. mojavensis* induced thickening (seven days) and vacuolization (14 days) (Figures 3C and 3H); *B. thuringiensis* caused slight swellings (seven days) and curvature (14 days) (Figures 3D and 3I), while *L. sphaericus* generated major changes in morphology by forming closer septa and cell vacuolization from the seven days of culture (Figures 3E and 3J).

In general, rhizobacteria affected the morphology of hyphae of *F. verticillioides*, primarily with regard to thickness, roughness, vacuolization and probably at the output of intracellular material. Other research has shown that rhizobacteria can affect the morphology of *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (Basha & Ulaganathan, 2002). In particular, it is known that various species of the genus *Bacillus* affect the morphology of hyphae of different fungi and has been proposed that antagonist microorganisms may induce various defense mechanisms in fungi, among them the deposition of chitin in the cell wall. However, it has been reported that some *Bacillus* species are able to

Mitchell, Snook, & Olubajo, 2012). La rizobacteria *B. mojavensis* posee un mecanismo antagonista complejo aún no conocido por completo, donde además de producir los compuestos mencionados se relaciona también la producción de surfactinas con la actividad antifúngica (Bacon et al., 2012). Los tratamientos con *B. thuringiensis* indujeron menores cambios en el color y aspecto del micelio de *F. verticillioides*, pero el crecimiento micelial del hongo fue también de forma cuadrada (Figuras 2H, 2I y 2J). Recientemente, Rocha et al. (2014) demostraron en pruebas *in vitro* que *B. thuringiensis* suprime el crecimiento e inhibe la producción de fumosina de *F. verticillioides*, por lo que concluyeron que la bacteria, además de su capacidad para controlar plagas insectiles, tiene potencial como agente de control biológico de hongos fitopatógenos. Asimismo, *L. sphaericus* mostró crecimiento rápido y actividad inhibitoria elevada cuando se cultivó de manera dual con *F. verticillioides* (Figura 2K). Un estudio reciente evidenció una elevada actividad de *Lysinibacillus* sp. contra diversas bacterias y hongos (Ahmad, Iqbal, Haseeb, & Khan, 2014); la actividad antimicrobiana se atribuyó a las bacteriocinas, sugiriendo que dicha bacteria representa una alternativa para controlar el deterioro microbiano de productos alimenticios.

En general, las rizobacterias son muy diversas y pueden tener potencial como agentes de control biológico con base en su actividad antagonista, destacando las especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales pueden inhibir el desarrollo de fitopatógenos tales como *Fusarium oxysporum* Schlechtendal, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Pythium* spp. (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012). En particular, en la rizósfera de *J. curcas* se han aislado bacterias del género *Enterobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* con el objetivo de promover el crecimiento vegetal, pero sin evaluar la actividad antifúngica de estas rizobacterias (Jha, Patel, & Saraf, 2012; Patel & Saraf, 2013); por tanto, los resultados obtenidos en esta investigación son de interés para el manejo de enfermedades fúngicas del cultivo.

Efecto de las rizobacterias en la morfología de las hifas de *F. verticillioides*

La Figura 3 muestra las hifas de *F. verticillioides* tratadas con diferentes rizobacterias. A los 7 y 14 días, el testigo presentó hifas septadas rectilíneas con grosor uniforme y contenido celular homogéneo (Figuras 3A y 3F). Las rizobacterias causaron afectaciones en la morfología hifal manifestadas de varias formas. *B. subtilis* provocó encurvamiento y engrosamiento que desencadenó la vacuolización celular a los 14 días (Figuras 3B y 3G); *B. mojavensis* indujo engrosamiento (siete días) y vacuolización (14 días) (Figuras 3C y 3H); *B. thuringiensis* provocó ligeros engrosamientos (siete días) y encurvamientos (14 días) (Figuras 3D y 3I),

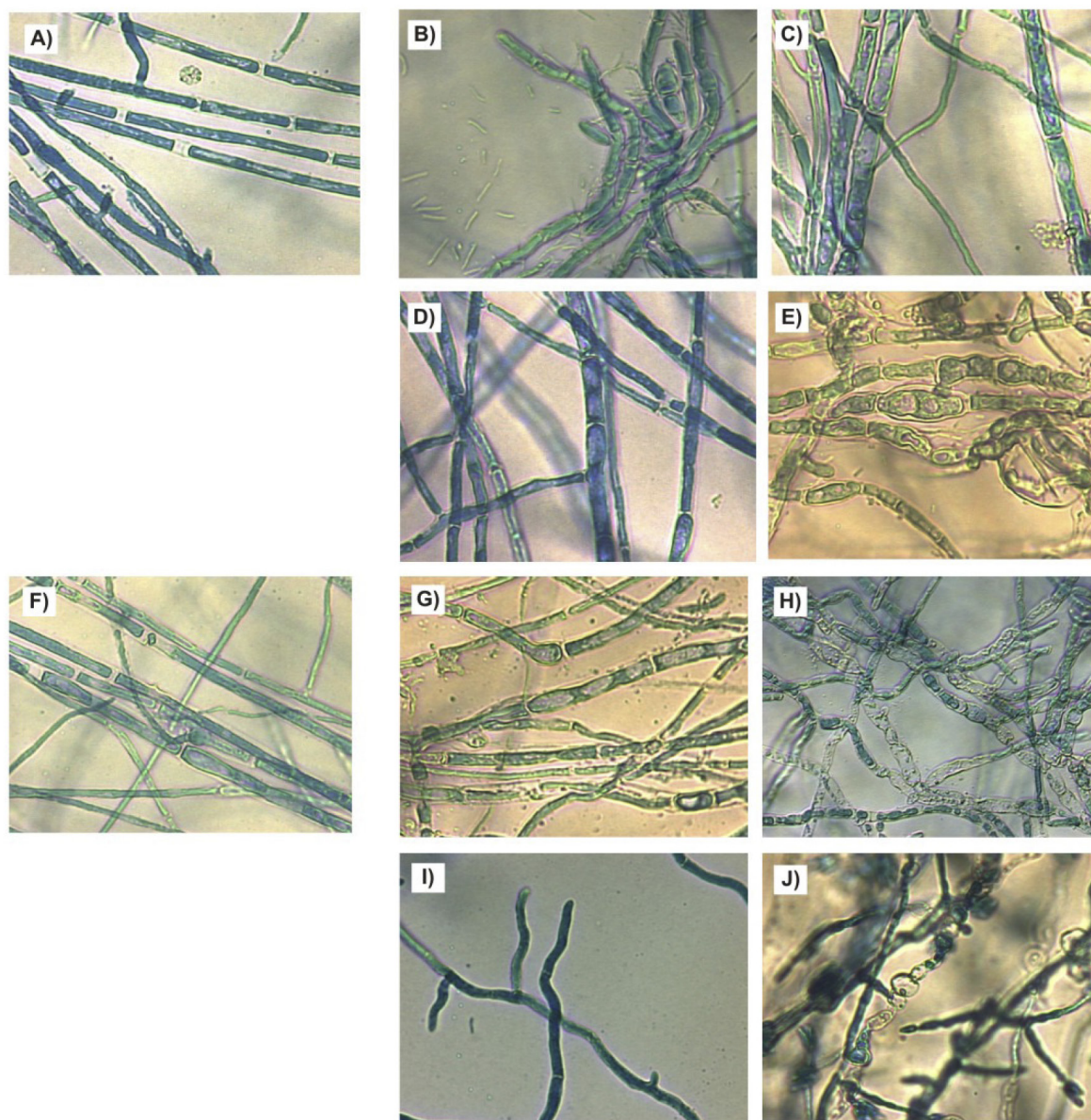


Figure 3. Hyphal morphology of *F. verticillioides* by effect of rhizospheric bacteria for seven and 14 days of growth on nutrient agar at 28 °C. A) Control 7 d, B) *B. subtilis* 7 d, C) *B. mojavensis* 7 d, D) *B. thuringiensis* 7 d, E) *L. sphaericus* 7 d, F) Control 14 d, G) *B. subtilis* 14 d, H) *B. mojavensis* 14 d, I) *B. thuringiensis* 14 d, J) *L. sphaericus* 14 d.

Figura 3. Morfología hifal de *F. verticillioides* por efecto de bacterias rizosféricas durante siete y 14 días de crecimiento en agar nutritivo a 28 °C. A) Control 7 d, B) *B. subtilis* 7 d, C) *B. mojavensis* 7 d, D) *B. thuringiensis* 7 d, E) *L. sphaericus* 7 d, F) Control 14 d, G) *B. subtilis* 14 d, H) *B. mojavensis* 14 d, I) *B. thuringiensis* 14 d, J) *L. sphaericus* 14 d.

overcome these defenses and provoke severe damage in the fungal cells (Chérif et al., 2002).

Mortality and weight reduction of *L. zonatus* by the effect of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus*

Under the study conditions, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* had no statistically significant effect ($P = 0.05$) on the mortality of the nymph 4 of *L. zonatus* regarding the control. Similarly, there was no significant effect of

mientras que *L. sphaericus* generó mayores cambios en la morfología mediante la formación de septos más cercanos y vacuolización celular desde los siete días de cultivo (Figuras 3E y 3J).

En general, las rizobacterias afectaron la morfología de las hifas de *F. verticillioides*, fundamentalmente en lo relativo al grosor, rugosidad, vacuolización y, probablemente, en la salida de material intracelular. Otras investigaciones han mostrado que las rizobacterias

bacteria on the weight of the nymph 4 to the nymph 5 regarding the control (Table 2).

In this study, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* had no entomopathogenic effect on *L. zonatus*. There are few studies where the application of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* has been successful on the control of Hemiptera. In this regard, Schünemann, Knaak, and Fiuza (2014) mentioned little is known about the toxicity of *B. thuringiensis* on the Hemiptera order, because there are few studies evaluating the effect. Most successful studies on entomopathogenic activity of bacteria have been tested in the larval stage of holometabolous insects that feed chewing leaves. After the bacteria are ingested, toxins are inserted into the peritrophic membrane of the midgut which act by forming pores, causing vacuolization of the cytoplasm and subsequently a cell disruption, which causes that the insect cannot eat and eventually die. Hemiptera evolved to feed liquid diet (Stockhoff & Conlan, 2003), developing a sucking-biting oral cavity, so the midgut morphology varies, functional activity, lacks peritrophic membrane and particular hydrolytic digestive enzymes such as trypsin, necessary for the action of toxins. For this reason, toxins of *B. thuringiensis* did not interact with the digestive tract of the insect; however, recently it has succeeded in expressing an insecticidal protein of 35 kDa of this bacteria affecting survival and development of *Lygus hesperus* (Knight) in transgenic cotton plants (Baum et al., 2012). This means that there may be toxic proteins against bedbugs, but we have to investigate how such proteins interact with the digestive tract of bedbugs. Therefore, in later studies it is important to seek the most effective way of providing bacteria to insects.

Taking into account that this is the first study that evaluates the entomopathogenic activity of *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* on *L. zonatus*, because so far there are no reports of studies performed in these organisms, it is necessary to consider the study in

pueden afectar la morfología de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (Basha & Ulaganathan, 2002). En particular, se conoce que diversas especies del género *Bacillus* afectan la morfología de las hifas de diferentes hongos y se ha propuesto que los microorganismos antagonistas puedan inducir distintos mecanismos de defensa en los hongos, entre los que destaca la deposición de quitina en la pared celular. No obstante, se ha informado que algunas especies de *Bacillus* son capaces de superar estas defensas y causar daños severos en las células fúngicas (Chérif et al., 2002).

Mortalidad y reducción del peso de *L. zonatus* por efecto de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus*

Bajo las condiciones de estudio, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* no tuvieron efecto estadísticamente significativo ($P = 0.05$) sobre la mortalidad de la ninfa 4 de *L. zonatus* con respecto al testigo. De manera similar, tampoco hubo efecto significativo de las bacterias sobre el peso de la ninfa 4 a la ninfa 5 con respecto al testigo (Cuadro 2).

En el presente trabajo, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* no tuvieron efecto entomopatógeno sobre *L. zonatus*. Existen pocos estudios donde la aplicación de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* haya sido exitoso sobre el control de Hemiptera. Al respecto, Schünemann, Knaak, y Fiuza (2014) mencionaron que realmente se sabe poco sobre la toxicidad de *B. thuringiensis* sobre la orden Hemiptera, debido a que existen pocos trabajos que evalúan el efecto. La mayoría de los estudios exitosos sobre la actividad entomopatógena de las bacterias se han probado en la etapa larval de insectos holometábolos que se alimentan masticando hojas. Después de que las bacterias son ingeridas, las toxinas se insertan en la membrana peritrofica del intestino medio donde actúan formando poros, causando la vacuolización del citoplasma y, posteriormente, una disrupción celular, ocasionando que el insecto no pueda alimentarse y finalmente muera. Los hemípteros

Table 2. Effect of *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus* on mortality and weight of *Leptoglossus zonatus*. Cuadro 2. Efecto de *Bacillus thuringiensis* y *Lysinibacillus sphaericus* sobre la mortalidad y peso de *Leptoglossus zonatus*.

Treatments / Tratamientos	<i>Leptoglossus zonatus</i>	
	Mortality (%)* / Mortalidad (%)*	Nymph weight 4 to 5 (mg)** / Peso ninfa 4 a 5 (mg)**
Control / Testigo	33.33 a	50.16 ± 18.80 a
<i>Bacillus thuringiensis</i>	46.66 a	42.61 ± 12.04 a
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	36.66 a	44.02 ± 17.21 a

*Chi-square (χ^2), **One-way ANOVA. Same letters in the same column indicate no statistically significant differences according to the method Holm-Sidak ($P = 0.05$).

*Chi-cuadrada (χ^2), **ANOVA de una vía. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas significativas de acuerdo con el método Holm-Sidak ($P = 0.05$).

other biological stages of the insect and concentrations of protein crystals. It is especially important to find a mechanism for toxic proteins of these bacteria can act in the digestive system of the Heteroptera, through an enzyme capable of initiating the process in the digestive tract of bedbugs.

Conclusions

Bacillus subtilis, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* rhizospheric bacteria inhibited mycelial growth and affected the hyphal morphology of *F. verticillioides* regardless of the medium and times of culture used. *B. thuringiensis* and *L. sphaericus* rhizobacteria did not affect mortality or the development of *L. zonatus*. In general, strains of rhizospheric bacteria showed antagonistic activity against *F. verticillioides* and showed no entomopathogenic activity against *L. zonatus*. This study can extend the potential use of antagonistic bacteria that may be used within the strategies of integrated management of pests and disease.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support for the realization of this study provided by the Instituto Politécnico Nacional through the Secretaría de Investigación y Posgrado.

End of English version

References / Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267. doi: 10.1093/jee/18.2.265a
- Ahmad, V., Iqbal, A. M. Z., Haseeb, M., & Khan, M. S. (2014). Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus* jx416856 against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste. *Anaerobe*, 27, 87-95. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.04.001
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2002). Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biological Control*, 23, 274-284. doi: 10.1006/bcon.2001.1016
- Bacon, C. W., Hinton, D. M., Mitchell, T. R., Snook, M. E., & Olubajo, B. (2012). Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. *Biological Control*, 62, 1-9. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.03.006
- Basha, S., & Ulaganathan, K. (2002). Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science*, 82, 1457-1463. Retrieved from <http://www.iisc.ernet.in/currsci/jun252002/1457.pdf>
- Basili, M., & Fontini, F. (2012). Biofuel from *Jatropha curcas*: Environmental sustainability and option

evolucionaron para alimentarse de dieta líquida (Stockhoff & Conlan, 2003), desarrollando un aparato bucal picador chupador, por lo que el intestino medio varía en morfología, actividad funcional, carece de membrana peritrófica y de ciertas enzimas digestivas hidrolíticas como la tripsina, necesarias para la acción de las toxinas. Por tal razón, las toxinas de *B. thuringiensis* no interaccionaron con el tracto digestivo del insecto; sin embargo, recientemente se ha logrado expresar una proteína insecticida de 35 kDa de dicha bacteria que afecta la supervivencia y el desarrollo de la chinche *Lygus hesperus* (Knight) en plantas transgénicas de algodón (Baum et al., 2012). Lo anterior significa que pueden existir proteínas tóxicas contra chinches, pero se tiene que investigar la manera de que tales proteínas interaccionen con el tracto digestivo de las chinches. Por lo tanto, en trabajos posteriores es importante buscar la forma más efectiva de proporcionar las bacterias a los insectos.

Considerando que este es el primer trabajo que evalúa la actividad entomopatógena de *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* sobre *L. zonatus*, ya que hasta la fecha no existen reportes de trabajos realizados en estos organismos, es necesario considerar la evaluación en otros estados biológicos del insecto y concentraciones de cristales proteicos. Sobre todo es importante buscar un mecanismo para que las proteínas tóxicas de estas bacterias puedan actuar en el sistema digestivo de los Heteroptera, a través de una enzima capaz de iniciar el proceso en el tracto digestivo de las chinches.

Conclusiones

Las bacterias rizosféricas *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* inhibieron el crecimiento micelial y afectaron la morfología hifal de *F. verticillioides* con independencia del medio y tiempos de cultivo utilizados. Las rizobacterias *B. thuringiensis* y *L. sphaericus* no afectaron la mortalidad ni el desarrollo de *L. zonatus*. En general, las cepas de bacterias rizosféricas evidenciaron actividad antagonista contra *F. verticillioides* y no mostraron actividad entomopatógena contra *L. zonatus*. Este trabajo permite ampliar el potencial de uso de bacterias antagonistas que puedan ser empleadas dentro de las estrategias de manejo integrado de plagas y enfermedades.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo financiero para la realización de este trabajo brindado por el Instituto Politécnico Nacional a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado.

Fin de la versión en español

- value. *Ecological Economics*, 78, 1-8. doi: 10.1016/j.ecolecon.2012.03.010
- Baum, J. A., Sukuru, U. R., Penn, S. R., Meyer, S. E., Subbarao, S., Shi, X., ... & Clark, T. L. (2012). Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *Journal of Economic Entomology*, 105, 616-624. doi: 10.1603/EC11207
- Becker, K., Wulfmeyer, V., Berger, T., Gebel, J., & Münch, W. (2013). Carbon farming in hot, dry coastal areas: An option for climate change mitigation. *Earth System Dynamics*, 4, 237-251. doi: 10.5194/esd-4-237-2013
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1044-1051. doi: 10.1590/S1415-47572012000600020
- Berry, C. (2012). The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 1-10. doi: 10.1016/j.jip.2011.11.008
- Chérif, M., Sadfi, N., Benhamou, N., Boudabbous, A., Boubaker, A., Hajlaoui, M. R., & Tirilly, Y. (2002). Ultrastructure and cytochemistry of *in vitro* interactions of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *B. thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum*. *Journal of Plant Pathology*, 84, 83-93. doi: 10.4454/jpp.v84i2.1091
- Dharmaputra, O. S., Worang, R. L., Syarief, R., & Tahudin, M. (2009). The quality of physic nut (*Jatropha curcas*) seed affected by water activity and duration of storage. *Microbiology Indonesia*, 3, 139-145. Retrieved from <http://jurnal.permi.or.id/index.php/mionline/article/view/138/15>
- Dias, L. A. S., Missio, R. F., & Dias, D. C. F. S. (2012). Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), a plant species with potential for biodiesel production. *Genetics and Molecular Research*, 11, 2719-2728. doi: 10.4238/2012.June.25.6
- Dussán, J. G., Andrade, D. R. L., Lozano, L. C. A., Vanegas, S. P. M. (2002). Physiologic and genetic characterization of *Bacillus sphaericus* native strains. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4, 89-99. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30097/30289>
- Fresnedo-Ramírez, J., & Orozco-Ramírez, Q. (2013). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60, 1087-1104. doi: 10.1007/s10722-012-9906-7
- Grimm, C., & Somarriba, A. (1999). Suitability of physic nut (*Jatropha curcas* L.) as single host plant for the leaf-footed bug *Leptoglossus zonatus* Dallas (Het., Coreidae). *Journal of Applied Entomology*, 123, 347-350. doi: 10.1046/j.1439-0418.1999.00380
- Guo, Z., Chen, R., Xing, R., Liu, S., Yu, H., Wang, P., ...Li, P. (2006). Novel derivatives of chitosan and their antifungal activities *in vitro*. *Carbohydrate Research*, 341(3), 351-354. doi: 10.1016/j.carres.2005.11.002
- Jha, C. K., Patel, D., & Saraf, M. (2012). Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 891-899. doi: 10.1007/s11274-011-0886-0
- Latha, P., Anand, T., Prakasam, V., Jonathan, E. I., Paramathma, M., & Samiyappan, R. (2011). Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Applied Soil Ecology*, 49, 215-223. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.05.003
- McPherson, J. E., Packauskas, R. J., Taylor, S. J., & O'Brien, M. F. (1990). Eastern range extension of *Leptoglossus occidentalis* with a key to *Leptoglossus* species of America North of Mexico (Heteroptera: Coreidae). *Great Lakes Entomology*, 23, 99-104.
- Patel, D., & Saraf, M. (2013). Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of *Jatropha curcas* L. under saline condition. *European Journal of Soil Biology*, 55, 47-54. doi: 10.1016/j.ejsobi.2012.12.004
- Poopathi, S., Mani, C., Thirugnanasambantham, K., Praba, V. L., Ahangar, N. A., & Balagangakharan, K. (2014). Identification and characterization of a novel marine *Bacillus cereus* for mosquito control. *Parasitology Research*, 113, 323-332. doi: 10.1007/s00436-013-3658-y
- Rocha, L. O., Tralamazza, S. M., Reis, G. M., Rabinovitch, L., Barbosa, C. B., & Corrêa, B. (2014). Multi-method approach for characterizing the interaction between *Fusarium verticillioides* and *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Kurstaki*. *PLoS ONE*, 9(4), e92189. doi:10.1371/journal.pone.0092189
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN Microbiology*, 2014, Article ID 135675. doi: 10.1155/2014/135675
- SigmaPlot. (2008). SigmaPlot. Exact graphs for exact sciences, V.11.0. Point Richmond, CA, USA: Systat Software Inc.
- Stockhoff, B., & Conlan, C. (2003). Control de plagas de insectos hemípteros con *Bacillus thuringiensis*. España: ES Patente núm. 2194108T3. 16-11-2003. Retrieved from http://www.espatentes.com/pdf/2194108_t3.pdf
- Tepole-García, R. E., Pineda-Guillermo, S., Martínez-Herrera, J., & Castrejón-Gómez, V. R. (2012). Records of two pest species, *Leptoglossus zonatus* (Heteroptera: Coreidae) and *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae), feeding on the physic nut, *Jatropha curcas*, in Mexico. *Florida Entomology*, 95, 208-210. doi: 10.1653/024.095.0135
- Terren, M., Mignon, J., Declerck, C., Jijakli, H., Savery, S., Jacquet de Haveskercke, ...Mergeai, G. (2012). Principal disease and insect pest of *Jatropha curcas* L. in the lower valley of the Senegal River. *Tropicultura*, 30, 222-229. Obtenido de <http://www.tropicultura.org/text/v30n4/222.pdf>
- Van Rooijen, L. W. (2014). Pioneering in marginal fields: *Jatropha* for carbon credits and restoring degraded land in Eastern Indonesia. *Sustainability*, 6, 2223-2247. doi: 10.3390/su6042223

Wani, S. P., Chander, G., Sahrawat, K. L., Srinivasa-Rao, Ch., Raghvendra, G., Susanna, P., & Pavani, M. (2012). Carbon sequestration and land rehabilitation

through *Jatropha curcas* L. plantation in degraded lands. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 161, 112-120. doi: 10.1016/j.agee.2012.07.028