

Isolated rhizobacteria of *Jatropha curcas* L.: antagonistic activity of phytopathogens and plant growth promoter

Rizobacterias aisladas de *Jatropha curcas* L.: actividad antagonista de fitopatógenos y promotora del crecimiento de plantas

Erubiel Toledo-Hernández^{1*}; Guadalupe Peña-Chora²; Jeiry Toribio-Jiménez¹; Yanet Romero-Ramírez¹; Alejandro Bolaños-Dircio¹; Miguel G. Velázquez-del Valle³; Ana N. Hernández-Lauzardo³; Renato León-Rodríguez⁴; Silvana Vero⁵

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas s/n. C. P. 39087. Chilpancingo, Guerrero, México.

²Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad núm. 1001, col. Chamilpa. C. P. 62209. Cuernavaca, Morelos, México.

³Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Ctra. Yauatepec-Jojutla km 6, calle CEPROBI núm. 8, col. San Isidro. C. P. 62731. Yauatepec, Morelos, México.

⁴Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Tercer circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria. C. P. 04510. Coyoacán, Ciudad de México, México.

⁵Universidad de la República de Uruguay, Facultad de Química. General Flores núm. 2124, Montevideo, CC 1157. Uruguay.

*Corresponding author: erubielth@hotmail.com; tel.: 777 418 7389

Abstract

Introduction: *Jatropha curcas* L. is a species native to Mexico that has recently been considered an important crop to produce biofuel.

Objective: To isolate and identify rhizobacteria from *J. curcas* with antagonistic activity against phytopathogenic fungi (*Curvularia lunata* and *Fusarium equiseti*) of this crop and evaluate their capacity to promote tomato plant growth.

Materials and methods: The isolates were obtained by serial dilution and antagonistic activity was assessed by volatile and diffusible compounds on PDA medium. In addition, the production of antifungal compounds and metabolites that promote the plant growth were determined. The isolates were identified by amplifying the 16S RNA and *sodA* genes. Finally, the isolates were inoculated on tomato seeds to evaluate plant growth promotion and germination.

Results and discussion: The antagonistic bacteria were identified as *Bacillus mojavensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The antifungal effect on the mycelial growth of *C. lunata* and *F. equiseti* was due to the presence of volatile and diffusible compounds with between 30 % and 79 % inhibition. *Pseudomonas aeruginosa* showed the strongest inhibitory effect (48.7 to 79.8 %). *Bacillus subtilis* (A1), *B. mojavensis* (A4) and *B. thuringiensis* (A6, A8) showed the highest germination (70 % to 88 %). The vegetative growth of tomato plants treated with the isolates was significantly higher than the controls ($P < 0.05$).

Conclusion: Eight rhizobacteria isolated from *J. curcas* showed antagonistic activity against *C. lunata* and *F. equiseti* and demonstrated their capacity to improve the germination and promote growth in tomato plants.

Keywords: *Bacillus mojavensis*; *Bacillus subtilis*;
Bacillus thuringiensis;
Pseudomonas aeruginosa;
Curvularia lunata;
Fusarium equiseti.

Resumen

Introducción: *Jatropha curcas* L. es una especie nativa de México que recientemente se ha considerado un cultivo importante para la producción de biocombustible.

Objetivo: Aislar e identificar rizobacterias de *J. curcas* con actividad antagónica frente a hongos fitopatógenos (*Curvularia lunata* y *Fusarium equiseti*) del cultivo y evaluar la capacidad de estas para promover el crecimiento de plantas de jitomate.

Materiales y métodos: Las cepas bacterianas se obtuvieron por dilución en serie. La actividad antagonista se evaluó mediante compuestos volátiles y difusibles en medio de cultivo PDA; además, se determinó la producción de compuestos antifúngicos y metabolitos que promueven el crecimiento de plantas. Las cepas se identificaron mediante la amplificación de los genes ARNr 16S y *sodA*; posteriormente, se inocularon en semillas de jitomate para evaluar la germinación de las plantas y la promoción del crecimiento.

Resultados y discusión: Las bacterias antagonistas se identificaron como *Bacillus mojavensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*. El efecto antifúngico sobre el crecimiento micelial de *C. lunata* y *F. equiseti* se debió a la presencia de compuestos volátiles y difusibles con inhibición de entre 30 % y 79 %. *Pseudomonas aeruginosa* mostró el efecto inhibitorio más fuerte (48.7 a 79.8 %). *Bacillus subtilis* (A1), *B. mojavensis* (A4) y *B. thuringiensis* (A6, A8) mostraron la mayor germinación (70 % a 88 %). El crecimiento de las plantas de jitomate tratadas con cepas bacterianas fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que el de las plantas testigo.

Palabras clave: *Bacillus mojavensis*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus thuringiensis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Curvularia lunata*; *Fusarium equiseti*.

Conclusión: Ocho aislados de rizobacterias de *J. curcas* mostraron actividad antagonista frente a *C. lunata* y *F. equiseti*, y demostraron su capacidad para mejorar la germinación y promover el crecimiento de las plantas de jitomate.

Introduction

Jatropha curcas L. is a perennial tropical species native to Mexico that has recently received much attention because of its role in the production of bio-diesel, an eco-friendly, biodegradable, and non-toxic fuel (Mazumdar, Singh, Babu, Siva, & Harikrishna, 2018). The oil extracted from *J. curcas* seeds is an important source of the fatty acids that are used to produce biofuel, and successful biofuel production depends heavily on the physicochemical properties and moisture content of *J. curcas* seeds (Keneni, Hvoslef-Eide, & Marchetti, 2019).

Previous studies have demonstrated that the quality of *J. curcas* seeds is affected by water activity, storage time and phytopathogenic fungi (Dharmaputra, Worang, Syarief, & Miftahudin, 2009). It has been shown that phytopathogenic fungi caused changes in the fatty acid content, which could affect the production of biofuels (Oluwatoyin & Anthony, 2019). In addition, it has been demonstrated that diverse fungal species, including *Aspergillus flavus*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium equiseti*, and *Curvularia lunata*, affect the germination of *J. curcas* seeds (Anjorin, Omolewa, & Salako, 2011; Pabón-Baquero, Velázquez-del Valle, Evangelista-Lozano, León-Rodríguez, & Hernández-Lauzardo, 2015). Traditionally, phytopathogenic fungi have been controlled with chemical fungicides. Nonetheless, it has been suggested that chemical fungicides represent a potential risk to the environment and human health, with the additional problem of generating fungal resistance (Yang et al., 2019). An alternative strategy is the use of antagonistic rhizobacteria as biological control agents for phytopathogenic fungi.

Introducción

Jatropha curcas L. es una especie tropical perenne nativa de México que recientemente ha recibido mucha atención, debido a su papel en la producción de biodiesel, un combustible ecológico, biodegradable y no tóxico (Mazumdar, Singh, Babu, Siva, & Harikrishna, 2018). El aceite extraído de semillas de *J. curcas* es una fuente importante de ácidos grasos que se utilizan para producir biocombustible; el éxito de esta producción depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas y el contenido de humedad de las semillas (Keneni, Hvoslef-Eide, & Marchetti, 2019).

En estudios anteriores se ha demostrado que la calidad de las semillas de *J. curcas* se ve afectada por la actividad del agua, el tiempo de almacenamiento y los hongos fitopatógenos (Dharmaputra, Worang, Syarief & Miftahudin, 2009). También se ha señalado que los hongos fitopatógenos provocan cambios en el contenido de ácidos grasos, lo que podría afectar la producción de biocombustibles (Oluwatoyin & Anthony, 2019); además, se ha demostrado que diversas especies de hongos, como *Aspergillus flavus*, *Rhizopus nigricans*, *Fusarium equiseti* y *Curvularia lunata* afectan la germinación de semillas de *J. curcas* (Anjorin, Omolewa & Salako, 2011; Pabón-Baquero, Velázquez-del Valle, Evangelista-Lozano, León-Rodríguez, & Hernández-Lauzardo, 2015). Tradicionalmente, los hongos fitopatógenos se han controlado con fungicidas químicos; no obstante, estos productos representan un riesgo potencial para el medio ambiente y la salud humana, con el problema adicional de que los hongos generan resistencia a estos (Yang et al., 2019). Una estrategia alterna es el uso de rizobacterias

There are few studies of the microbial diversity of the rhizosphere of *J. curcas*. However, the isolation of diverse plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) capable of solubilizing phosphates and producing hydrogen cyanide and siderophores has been reported previously (Jha & Saraf, 2012). In recent studies, these metabolites have been associated with protection against fungal diseases in many crops (Abo-Elyousr, Khalil Bagy, Hashem, Alamri, & Mostafa, 2019). Currently, to our knowledge, there is only one report on the use of antagonistic rhizobacteria isolated from *J. curcas* to control phytopathogenic fungi of this crop in India (Latha et al., 2011).

In addition to potential antifungal effects, a study has shown that bacteria isolated from the rhizosphere of *J. curcas* promote plant growth (Jha, Patel, & Saraf, 2012). This is an important possible application, since improper or excessive use of chemical fertilizers to promote growth causes environmental and health damage, so a development formulated based on bacteria is needed to offer better alternatives for reducing the consumption of chemical products. This effect could occur in plants other than *J. curcas* itself, such as the tomato, of which Mexico is the largest exporter worldwide (Saavedra, Figueroa, & Cauhi, 2017). Thus, the aim of this study was to isolate and identify bacteria from rhizospheric soil of *J. curcas* with antagonistic ability against two phytopathogenic fungi species (*C. lunata* and *F. equiseti*) of this crop and to evaluate its capacity to promote the growth of tomato plants. Bacterial strains with potential use as fertilizers may be offered as an alternative more environmentally friendly and useful to farmers.

Materials and methods

Isolation of rhizobacteria from *Jatropha curcas* and source of phytopathogenic fungi

Samples were collected in Yauatepec, Morelos, Mexico (18° 49' N, 99° 05' W) from rhizospheric soil of *J. curcas* from five sampling sites (one point in the centre and four on the edges of one field of 4 000 m²). Using sterile equipment, 100 g of rhizosphere soil from up to 15 cm depth at each point were collected. From homogenized samples, 10 g of rhizospheric soil was taken, deposited in 90 mL of sterile distilled water and stirred for one minute. Serial dilutions were carried out and 0.1 mL was spread on nutrient agar (NA). After 24 h of incubation at 28 ± 2 °C, single bacterial colonies with different morphological appearances were counted, purified and stored at 4 °C in NA. The phytopathogenic fungi *C. lunata* and *F. equiseti* were isolated from *J. curcas* seeds in previous work by Pabón-Baquero et al. (2015) and belong to the fungal collection of the Laboratory of Phytopathology, CEPROBI-IPN. The fungal strains were maintained on potato dextrose agar (PDA) plates at 28 ± 2 °C.

antagonistas como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos.

Existen pocos estudios sobre la diversidad microbiana de la rizosfera de *J. curcas*; sin embargo, se ha informado del aislamiento de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR) capaces de solubilizar fosfatos y producir cianuro de hidrógeno y sideróforos (Jha & Saraf, 2012). En estudios recientes, estos metabolitos se han asociado con la protección contra enfermedades fúngicas en muchos cultivos (Abo-Elyousr, Khalil Bagy, Hashem, Alamri & Mostafa, 2019). Actualmente, hasta donde se sabe, solo existe un informe sobre el uso de rizobacterias antagonistas aisladas de *J. curcas* para el control de hongos fitopatógenos de este cultivo en India (Latha et al., 2011).

Además de los posibles efectos antimicóticos, un estudio ha demostrado que las bacterias aisladas de la rizosfera de *J. curcas* promueven el crecimiento de plantas (Jha, Patel & Saraf, 2012). Esto se trata de una posible aplicación importante, ya que el uso inadecuado o excesivo de fertilizantes químicos, para promover el crecimiento, causa daños ambientales y sanitarios, por lo que se necesita el desarrollo de un formulado a base de bacterias para ofrecer mejores alternativas y así reducir el consumo de productos químicos. Este efecto podría producirse en plantas distintas de la propia *J. curcas*, como el jitomate, del que México es el mayor exportador (Saavedra, Figueroa, & Cauhi, 2017). Por tanto, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar las bacterias provenientes del suelo rizosférico de *J. curcas* con capacidad antagónica frente a dos especies de hongos fitopatógenos (*C. lunata* y *F. equiseti*) del cultivo y evaluar la capacidad de estas para promover el crecimiento de plantas de jitomate. Las cepas bacterianas con potencial uso pueden ser utilizadas como fertilizantes y ofrecerse como una alternativa más amigable con el medio ambiente y útil para los agricultores.

Materiales y métodos

Aislamiento de rizobacterias de *Jatropha curcas* y fuente de hongos fitopatógenos

Las muestras se colectaron en Yauatepec, Morelos, México (18° 49' N, 99° 05' O) a partir de suelo rizosférico de *J. curcas* en cinco sitios de muestreo (un punto en el centro y cuatro en los bordes de un campo de 4000 m²). Con un equipo estéril se recogieron 100 g de suelo rizosférico de hasta 15 cm de profundidad en cada punto. A partir de muestras homogeneizadas se tomaron 10 g de suelo rizosférico, se depositó en 90 mL de agua destilada estéril y se agitó durante un minuto. Se realizaron diluciones en serie y se esparcieron 0.1 mL en agar nutritivo (AN). Después de 24 h de incubación a 28 ± 2 °C, las colonias bacterianas con apariencias

Evaluation of antagonistic activity of bacterial isolates

The antagonistic activity of 70 bacterial isolates was assessed against *C. lunata* or *F. equiseti* by the dual culture technique on PDA. A 5-mm mycelial disc of fungal was placed at the centre of the Petri dishes. Five microliters (3×10^8 CFU·mL⁻¹) of four bacterial isolates were placed equidistant from the centre at four points of the Petri dishes. PDA plates inoculated with the pathogen alone were used as a control. The plates were incubated at 28 ± 2 °C until the mycelium reached the edges of the control plates. Bacterial isolates that showed inhibition of mycelial growth in the area of the agar were selected as potential antagonists (Karimi, Amini, Harighi, & Bahramnejad, 2012).

In vitro antagonistic activity by volatile compounds

The methodology described by Karimi et al. (2012) was carried out with some modifications. The bacterial isolated were streaked on NA, and at the same time, a 5 mm disc of a 7-d-old culture) of each fungal species was placed at the centre of another Petri dishes with PDA medium. Then both half-plates were placed face to face preventing physical contact between the fungi and the bacterium and were sealed with Parafilm to prevent loss of volatiles compounds. The plates were incubated at 28 ± 2 °C and the inhibition zone was measured with a digital calliper. The mean radius (mm) of fungal growth in the presence of each strain was compared to that of the control cultures (containing only a disc of each fungal species) to determine the percent inhibition of the mycelial growth using the formula $(C-T)/C * 100 \%$, where C = control and T = treatment.

In vitro antagonistic activity by diffusible compounds

The antagonistic activity of the bacterial isolates was assessed against *C. lunata* and *F. equiseti* by the dual culture technique on PDA. A 5-mm mycelial disc of each fungus was placed at the centre of the Petri dishes. Five microliters (3×10^8 CFU·mL⁻¹) of each bacterial isolate was placed at four points equidistant from the centre of the Petri dishes. PDA plates inoculated with the pathogen alone were used as controls. The plates were incubated at 28 ± 2 °C until the control plates showed full growth. The percent inhibition of the mycelial growth was determined as described previously (Karimi et al., 2012).

Morphological and molecular identification of antagonistic bacteria

Bacterial isolates that showed antagonistic activity towards the phytopathogenic fungi tested were selected for identification by morphological and

morfológicas diferentes se contaron, purificaron y almacenaron a 4 °C en AN. Los hongos fitopatógenos *C. lunata* y *F. equiseti* se aislaron de las semillas de *J. curcas* en trabajos anteriores de Pabón-Baquero et al. (2015) y pertenecen a la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología, CEPROBI-IPN. Las cepas fúngicas se mantuvieron en placas de agar papa dextrosa (PDA) a 28 ± 2 °C.

Evaluación de la actividad antagónica de aislamientos bacterianos

La actividad antagónica de 70 aislados bacterianos se evaluó frente a *C. lunata* o *F. equiseti* mediante la técnica de cultivo dual en PDA. Para ello, un disco micelial de 5 mm del hongo se colocó en el centro de las placas de Petri. Cinco microlitros (3×10^8 UFC·mL⁻¹) de cuatro aislados bacterianos se colocaron equidistantes del centro en cuatro puntos de las placas de Petri. Las placas de PDA inoculadas solo con el patógeno se utilizaron como testigo. Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que el micelio alcanzó los bordes de las placas testigo. Los aislados bacterianos que mostraron inhibición de crecimiento del micelio en el área del agar se seleccionaron como antagonistas potenciales (Karimi, Amini, Harighi, & Bahramnejad, 2012).

Actividad antagónica *in vitro* de compuestos volátiles

La metodología descrita por Karimi et al. (2012) se llevó a cabo con algunas modificaciones. Las bacterias aisladas se estriaron en placas de AN y, al mismo tiempo, el hongo (disco de 5 mm de un cultivo de 7 días) se colocó en el centro de otra placa de Petri con medio de cultivo PDA. Posteriormente, ambas medias placas se colocaron cara a cara impidiendo el contacto físico entre hongos y bacterias y se sellaron con Parafilm para evitar la pérdida de compuestos volátiles. Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C y la zona de inhibición se midió con un calibrador vernier digital. El radio medio (mm) de crecimiento del hongo en presencia de cada cepa bacteriana se comparó con el de los cultivos testigo (que contenían solo un disco de cada especie fúngica) para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio, mediante la fórmula $(C-T)/C * 100 \%$, donde C = testigo y T = tratamiento.

Actividad antagónica *in vitro* por compuestos difusibles

La actividad antagónica de los aislados bacterianos se evaluó frente a *C. lunata* y *F. equiseti* mediante la técnica de cultivo dual en PDA. Un disco micelial de 5 mm se colocó en el centro de las placas de Petri. Cinco microlitros (3×10^8 UFC·mL⁻¹) del aislado bacteriano se colocaron en cuatro puntos equidistantes del centro de las placas de Petri. Las placas de PDA inoculadas

molecular procedures. Genomic DNA was extracted and purified using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ kit. Amplification of the 16S rRNA gene sequences of antagonistic isolates was carried out as described by Weisburg, Barns, Pelletier, and Lane (1991). Additionally, the PCR amplification of the internal portion of the *sodA* gene sequences in some isolates was achieved according to Gatson et al. (2006). To identify the *Bacillus thuringiensis* isolate, which harbours any of the *cry1*, *cry2* and/or *cry7* genes, PCR analysis was carried out with specific primers (Ben-Dov et al., 1997; Ceron, Ortíz, Quintero, Güereca, & Bravo, 1995; Sauka, Cozzi, & Benintende, 2005). The nucleotide sequences of the 16S rRNA and *sodA* were compared with sequences from the NCBI database (National Center for Biotechnology Information, 2020) using the BLAST tool. The alignment of multiple sequences and maximum likelihood phylogenetic analysis were performed with the program MEGA 5 (Tamura et al., 2011). The reliability of the phylogenetic tree was evaluated using a bootstrap test with 1 000 replicates.

Production of antifungal compounds by antagonistic bacteria

Each antagonistic bacterial isolate was tested directly to produce hydrogen cyanide (HCN), siderophores, proteases, and chitinases as follows. Production of HCN was assessed on nutrient agar medium and bacterial culture were streaked on the surface, then sterilized filter papers were soaked in 2.0 % Na_2CO_3 in 5.0 % (w/v) picric acid and placed in the lid of the Petri dish. The Petri dishes were sealed with parafilm and incubated at 30 °C for 4 days. A change in the color of the filter paper from yellow to reddish-brown was positive for cyanogenic activity (Karimi et al., 2012). Siderophore production was determined with a chrome azurol sulfonate (CAS) agar plate assay using Grimm Allen medium as a base (Baakza, Vala, Dave, & Dube, 2004; Schwyn & Neilands, 1987). Protease activity was determined from clearing zones in skimmed milk agar (SMA), according to Chantawannakul, Oncharoen, Klanbut, Chukeatirote, and Lumyong (2002). Chitinase activity was determined by streaking each strain on a culture medium containing 6.7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ yeast nitrogen base, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ colloidal chitin, and 15 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar. Chitinase production was assessed by visual examination of cleared zones developed around colonies incubated at 28 ± 2 °C for 72 h.

Screening for plant growth-promoting activities by rhizobacteria

Phosphate solubilization and quantification of indole-3-acetic acid (IAA)

Phosphate solubilization was determined from clearing zones in the culture medium. Bacterial culture was streaked onto the surface of inorganic phosphate agar

solo con el patógeno se utilizaron como testigos. Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que las placas testigo mostraron crecimiento completo. El porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio se determinó como se describió anteriormente (Karimi et al., 2012).

Identificación morfológica y molecular de las bacterias antagonistas

Los aislados bacterianos que mostraron actividad antagónica hacia los hongos fitopatógenos examinados se seleccionaron mediante procedimientos morfológicos y moleculares para su identificación. El ADN genómico se extrajo y purificó utilizando el kit MiniPrep™ de ADN bacteriano y fúngico ZR. Las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados antagonistas se amplificaron según lo descrito por Weisburg, Barns, Pelletier, y Lane (1991); además, con base en Gatson et al. (2006), se logró la amplificación por PCR de la porción interna de las secuencias del gen *sodA* en algunas cepas. Para identificar la cepa *Bacillus thuringiensis*, que alberga cualquiera de los genes *cry1*, *cry2* y *cry7*, se hizo un análisis PCR con cebadores específicos (Ben-Dov et al., 1997; Ceron, Ortíz, Quintero, Güereca, & Bravo, 1995; Sauka, Cozzi, & Benintende, 2005). Las secuencias de nucleótidos del ARNr 16S y *sodA* se compararon con las secuencias de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2020) utilizando la herramienta BLAST. La alineación de las secuencias múltiples y el análisis filogenético de máxima probabilidad se realizaron con el programa MEGA 5 (Tamura et al., 2011). La fiabilidad del árbol filogenético se evaluó utilizando una prueba de *bootstrap* con 1 000 réplicas.

Producción de compuestos antimicóticos por bacterias antagonistas

Cada aislado bacteriano antagonista se probó directamente para la producción de cianuro de hidrógeno (HCN), sideróforos, proteasas y quitinasas de la manera siguiente. La producción de HCN se evaluó en un medio de cultivo AN, donde el cultivo bacteriano se esparció en la superficie; posteriormente, los filtros esterilizados se empaparon en 2.0 % de Na_2CO_3 en ácido pícrico al 5.0 % (p/v) y se colocaron en la cubierta de la placa de Petri. Las placas de Petri se sellaron con Parafilm y se incubaron a 30 °C durante 4 días. El cambio de color del filtro de amarillo a café rojizo fue positivo para la actividad cianogénica (Karimi et al., 2012). La producción de sideróforos se determinó con un ensayo en placa de agar cromo azurol sulfonato (CAS), utilizando como base el medio Grimm Allen (Baakza, Vala, Dave, & Dube, 2004; Schwyn & Neilands, 1987). La actividad de proteasas se determinó a partir de la presencia de halos claros en agar de leche desnatada (SMA), según Chantawannakul, Oncharoen, Klanbut, Chukeatirote, y Lumyong (2002). La actividad

(10 g·L⁻¹ glucose, 0.5 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.3 g·L⁻¹ NaCl, 0.3 g·L⁻¹ KCl, 0.03 g·L⁻¹ FeSO₄, 0.03 g·L⁻¹ MnSO₄, 0.3 g·L⁻¹ MgSO₄, and pH 7.2) with calcium phosphate (1 g·L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂) as the sole P source (Qian et al., 2010). The Petri dishes were incubated for 3-7 days (28 ± 2 °C).

The production of IAA was determined as described by Karimi et al. (2012). Briefly, bacterial strains were inoculated into nutrient broth (5 g·L⁻¹ casein peptone, 1.5 g·L⁻¹ yeast extract, 1.5 g·L⁻¹ beef extract, and 5 g·L⁻¹ NaCl) with or without tryptophan (500 µg·mL⁻¹) and incubated at 30 °C for 3 days. A 5-mL culture was removed from each tube and centrifuged at 12 000 x g for 15 min. A 2 mL aliquot of supernatant was transferred to a fresh tube to which 100 µL of 10 mM orthophosphoric acid and 4 mL of reagent (1 mL of 0.5 M FeCl₃ in 50 mL of 35 % HClO₄) were added. The mixture was incubated at room temperature for 30 min, and the absorbance was read at 530 nm.

Germination and growth promotion

Tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L. "Bola") were disinfected with ethanol and sodium hypochlorite. Briefly, seeds were selected by the buoyancy method and then disinfected for 1 min in 5 % commercial sodium hypochlorite, then immersed in 70 % ethanol for 1 min, and finally, washed three times with sterile distilled water.

The bacterial strains A1, A2, A3, A4, A5, A6 and A8 were inoculated on Luria-Bertani agar (LB agar: 10 g·L⁻¹ casein peptone, 5 g·L⁻¹ yeast extract, 10 g·L⁻¹ NaCl, 15 g·L⁻¹ agar and 7.2 pH adjusted and sterilized) and incubated for 24 h at 30 °C. According to the 0.5 Mcfarland scale (1.5 x 10⁸ UFC·mL⁻¹), bacterial suspension was prepared in 0.9 % saline solution as inoculum for the germination and growth promotion tests. The bacterium *P. aeruginosa* was not tested in *in vivo* bioassays to avoid contaminating the environment with this opportunist pathogen to humans.

Twenty seeds per strain were used for the germination bioassay. Seeds were immersed in the bacterial suspension with agitation for 2 h at 180 rpm. The negative control seeds were immersed in 0.9 % saline solution with the same conditions described above. Seeds were sown in a seedbed with sterilized soil substrate, and germination percentage was recorded for the next 15 days.

To evaluate growth promotion, the germinated seeds were placed in a cup with sterilized soil substrate in a greenhouse at 30 ± 2 °C and 70 ± 5 % relative humidity with a 10 h light/14 h dark photoperiod. Fertilization and bacterial suspension inoculation were performed as follows: after seedlings were transplanted, the

de quitinasas se determinó inoculando cada cepa en un medio de cultivo con 6.7 g·L⁻¹ de base de nitrógeno de levadura, 5 g·L⁻¹ de quitina coloidal y 15 g·L⁻¹ de agar. La producción de quitinasas se evaluó mediante el examen visual de zonas claras alrededor de las colonias incubadas a 28 ± 2 °C durante 72 h.

Análisis de actividades promotoras del crecimiento de plantas por rizobacterias

Solubilización de fosfatos y cuantificación del ácido indol-3-acético (IAA)

La solubilización de fosfatos se determinó a partir de zonas claras en medio de cultivo. Los cultivos bacterianos se esparcieron en superficie de agar fosfato inorgánico (10 g·L⁻¹ glucosa, 0.5 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.3 g·L⁻¹ NaCl, 0.3 g·L⁻¹ KCl, 0.03 g·L⁻¹ FeSO₄, 0.03 g·L⁻¹ MnSO₄, 0.3 g·L⁻¹ MgSO₄ y pH 7.2) con fosfato de calcio (1 g·L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂) como única fuente de P (Qian et al., 2010). Las placas de Petri se incubaron durante 3 a 7 días (28 ± 2 °C).

La producción de IAA se determinó según lo descrito por Karimi et al. (2012). En resumen, se inocularon cepas bacterianas en caldo de cultivo (5 g·L⁻¹ de peptona de caseína, 1.5 g·L⁻¹ de extracto de levadura, 1.5 g·L⁻¹ de extracto de carne y 5 g·L⁻¹ de NaCl) con o sin triptófano (500 µg·mL⁻¹) y se incubaron a 30 °C durante 3 días. Un cultivo de 5 mL se extrajo de cada tubo y se centrifugó a 12 000 x g durante 15 min. Una alícuota de 2 mL de sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo al que se añadieron 100 µL de ácido ortofosfórico de 10 mM y 4 mL de reactivo (1 mL de 0.5 M FeCl₃ en 50 mL de HClO₄ al 35 %). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y la absorbancia se leyó a 530 nm.

Germinación y promoción de crecimiento

Las semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L. "Bola") se desinfectaron con etanol e hipoclorito de sodio. En resumen, las semillas se seleccionaron por el método de flotación y luego se desinfectaron durante 1 min en hipoclorito de sodio comercial al 5 %; posteriormente, se sumergieron en etanol al 70 % por 1 min y, por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Las cepas bacterianas A1, A2, A3, A4, A5, A6 y A8 se inocularon en agar Luria-Bertani (agar LB: 10 g·L⁻¹ de peptona de caseína, 5 g·L⁻¹ de extracto de levadura, 10 g·L⁻¹ de NaCl, 15 g·L⁻¹ de agar y pH 7.2 ajustado y esterilizado) y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Según la escala de Mcfarland de 0.5 (1.5 x 10⁸ UFC·mL⁻¹), se preparó una suspensión bacteriana en solución salina al 0.9 % como inóculo para los ensayos de germinación y promoción de crecimiento. La bacteria *P. aeruginosa* no se probó en bioensayos *in vivo* para evitar contaminar

positive controls were fertilized with 5 mL of Nitrofoska Blaukorn® classic (3 g·L⁻¹; 18 % N, 8 % P, 16 % K, and other nutrients); the treatments consisted of 5 mL of 0.5 Mcfarland scale of bacterial suspension of each strain, and the negative control was performed with sterilized distilled water. After six weeks of the bioassay, the stem diameter, plant length, number of leaves, plant fresh weight, and root fresh weight were recorded.

Experiments were conducted in a completely randomized design; three replicates with four repetitions each were performed. The data were analysed with ANOVA and means were compared with the Tukey test ($P < 0.05$) using SigmaPlot version 10.0 (Systat Software, Inc., 2007).

Results

Isolation and antagonistic activity of rhizobacteria from *Jatropha curcas*

A total of 124 isolates were obtained in nutrient agar medium from the rhizospheric soil of *J. curcas*. Only 70 isolates grew in the PDA medium. Colony appearance varied, coinciding with common bacterial morphotypes. In the antagonism tests, of the 70 bacteria isolates tested, eight isolates inhibited mycelial growth of *C. lunata* and *F. equiseti*, which were selected for their antagonistic activity (Table 1) and were designated as A1 to A8.

Effect of volatile and diffusible bacterial compounds on fungal mycelial growth

The results of the antagonistic effect of volatile or diffusible compounds on the mycelial growth of *F. equiseti* and *C. lunata* are shown in Table 1. In general, all isolates significantly inhibited the growth of fungal mycelia. However, the inhibition percentage varied with the fungal species and type of compounds evaluated. The A7 isolate showed the strongest inhibitory effect (48.7 to 79.8 %) on both fungal species and by both types of compounds. It is followed by the strains A5, A4, and A3 which showed inhibition of mycelial growth between 30 % and 57 % (Table 1).

Morphological characteristics and molecular identification of antagonistic rhizobacteria

Morphological characteristics and molecular identification of antagonistic rhizobacteria are shown in Table 2. The eight antagonistic bacteria isolated consisted of seven Gram-positive rods (A1-A6 and A8) and one Gram-negative rod (A7). Molecular identification was consistent with morphological characteristics for all isolates. The 16S rRNA gene sequences were deposited in GenBank and compared with those already found in the database. The results

el medio ambiente con este patógeno oportunista para los humanos.

Para el bioensayo de germinación se utilizaron 20 semillas por cepa. Las semillas se sumergieron en la suspensión bacteriana con agitación durante 2 h a 180 rpm. Las semillas testigo negativas se sumergieron en una solución salina al 0.9 % con las mismas condiciones descritas anteriormente. Las semillas se sembraron en un almácigo con sustrato de tierra esterilizado y se registró el porcentaje de germinación durante los siguientes 15 días.

Para evaluar la promoción de crecimiento, las semillas germinadas se colocaron en una taza con sustrato de tierra esterilizada en un invernadero a 30 ± 2 °C y 70 ± 5 % de humedad relativa con un fotoperíodo de 10 h de luz/14 h de oscuridad. La fertilización y la inoculación de la suspensión bacteriana se realizaron de la manera siguiente: después de trasplantar las plántulas, los testigos positivos se fertilizaron con 5 mL de Nitrofoska Blaukorn® classic (3 g·L⁻¹; 18 % de N, 8 % de P, 16 % de K y otros nutrientes); los tratamientos consistieron en 5 mL de la escala de Mcfarland 0.5 de suspensión bacteriana de cada cepa, y el control negativo fue agua destilada esterilizada. Después de seis semanas del bioensayo, se registraron el diámetro del tallo, la longitud de la planta, el número de hojas, el peso fresco de la planta y el peso fresco de la raíz.

Los experimentos se llevaron a cabo en un diseño completamente aleatorio; se tuvieron tres réplicas con cuatro repeticiones cada una. Los datos se analizaron con un ANOVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0.05$) utilizando SigmaPlot versión 10.0 (Systat Software, Inc., 2007).

Resultados

Aislamiento y actividad antagónica de rizobacterias de *Jatropha curcas*

Se obtuvo un total de 124 cepas bacterianas en medio de cultivo AN, provenientes del suelo rizosférico de *J. curcas*. Solo 70 aislamientos crecieron en medio de cultivo PDA. La apariencia de la colonia varió coincidiendo con morfotipos bacterianos comunes. En las pruebas de antagonismo, de las 70 cepas bacterianas analizadas, ocho cepas inhibieron el crecimiento del micelio de *C. lunata* y *F. equiseti*, las cuales se seleccionaron por su actividad antagónica (Cuadro 1) y se designaron con la nomenclatura de A1 a A8.

Efecto de los compuestos bacterianos volátiles y difusibles en el crecimiento de micelios fúngicos

Los resultados del efecto antagónico de los compuestos volátiles y difusibles en el crecimiento del micelio de

Table 1. Inhibition of mycelial growth of *Curvularia lunata* and *Fusarium equiseti* by volatile and diffusible compounds (experiments were incubated at 28 °C) of antagonistic bacterial isolates obtained from rhizospheric soil of *Jatropha curcas*.

Cuadro 1. Inhibición de crecimiento micelial de *Curvularia lunata* y *Fusarium equiseti* por compuestos volátiles y difusibles (experimentos incubados a 28 °C) de aislados bacterianos antagonistas obtenidos del suelo rizosférico de *Jatropha curcas*.

Bacterial isolates/ Cepas bacterianas	Inhibition of mycelial growth (%)/Inhibición del crecimiento del micelio (%)			
	Volatile compounds/Componentes volátiles		Diffusible compounds/Componentes difusibles	
	<i>C. lunata</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>C. lunata</i>	<i>F. equiseti</i>
Control/Testigo	0 a	0 a	0 a	0 a
A1	32.8 b	31.3 b	51.9 d	40.9 c
A2	29.1 b	32.1 b	51.6 d	41.4 c
A3	27.0 b	21.5 b	57.0 e	48.4 c
A4	43.0 bc	25.6 b	54.7 e	49.5 c
A5	35.0 b	31.2 b	55.3 e	45.8 c
A6	31.3 b	23.1 b	33.7 c	22.8 b
A7	66.6 c	48.7 c	76.3 f	79.8 d
A8	31.0 b	24.8 b	20.9 b	27.2 b

Different letters within columns indicate significant differences at $P < 0.05$, according to the Tukey test.

Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

showed four different antagonistic rhizobacteria species (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis*, and *Pseudomonas aeruginosa*).

The BLAST search revealed that the 16S rRNA gene sequence of A1 and A2 isolates were 100 % identical to *B. subtilis* JX123316. The 16S rRNA sequences of A3, A4, and A5 isolates showed 100 % matches with *B. mojavensis* KC519442 (A3 and A4) and JX126863 (A5). The A6 and A8 isolates were identified as two different strains of *B. thuringiensis* (100 % matching with *B. thuringiensis* KC683724 and KC692184, respectively). In addition, PCR analysis demonstrated that both isolates of *B. thuringiensis* contained *cry* genes. The taxonomic identification of the A7 isolate was confirmed with a 100 % identity with the 16S rRNA sequence of *P. aeruginosa* KC787580. Moreover, the *sodA* nucleotide sequences of A1 and A2 were found to be 99 % identical to *sodA* of *B. subtilis* CP002468 and CP003329, respectively. A3, A4, and A5 isolates were 99 % similar to *sodA* of *B. mojavensis* AY197618. The accession numbers obtained in this study from 16S rRNA and *sodA* nucleotide sequences are shown in Table 2.

Phylogenetic analysis

The phylogenetic trees constructed from the 16S rRNA and *sodA* gene sequences are shown in Figures 1 and 2, respectively. The 16S rRNA tree showed three distinct clusters: cluster 1 contained *B. mojavensis* and *B. subtilis* strains, cluster 2 contained *B. thuringiensis*, and cluster 3

F. equiseti y *C. lunata* se muestran en el Cuadro 1. En general, todas las cepas inhibieron significativamente el crecimiento de los micelios fúngicos; sin embargo, el porcentaje de inhibición varió según la especie del hongo y el tipo de compuesto evaluado. El aislado A7 mostró el efecto inhibitorio más fuerte (48.7 a 79.8 %) en ambas especies de hongos y para ambos tipos de compuestos, seguido de las cepas A5, A4 y A3 que mostraron una inhibición de crecimiento de micelio de entre 30 % y 57 % (Cuadro 1).

Características morfológicas e identificación molecular de rizobacterias antagonistas

Las características morfológicas y la identificación molecular de las rizobacterias antagonistas se muestran en el Cuadro 2. Las ocho bacterias antagonistas consistieron en siete bacilos Gram-positivo (A1-A6 y A8) y un bacilo Gram-negativo (A7). La identificación molecular fue consistente con las características morfológicas de todas las cepas. Las secuencias del gen ARNr 16S se depositaron en el GenBank y se compararon con las ya encontradas en la base de datos del NCBI. Los resultados mostraron cuatro especies de rizobacterias antagonistas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*).

La búsqueda de BLAST reveló que la secuencia del gen ARNr 16S de las cepas A1 y A2 fue 100 % idéntica a la de la cepa *B. subtilis* JX123316. Las secuencias ARNr 16S de las cepas A3, A4 y A5 mostraron identidad del

**Table 2. Morphological and molecular identification of antagonistic bacterial isolates obtained from rhizospheric soil of *Jatropha curcas*.
Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de los aislados bacterianos antagonistas obtenidos del suelo rizosférico de *Jatropha curcas*.**

Isolates / Cepas	Morphological characteristics / Características morfológicas		Molecular identification / Identificación molecular					
	Gram reaction / Tinción de Gram	Cell shape / Forma de la célula	GenBank (accession number) / GenBank (número de acceso)	Identity (%) / Identidad (%)	16S rRNA / 16S del ARNr	Identity (%) / Identidad (%)	GenBank (accession number) / GenBank (número de acceso)	Identity (%) / Identidad (%)
A1	+	rod/ barra	JX123316	100	<i>Bacillus subtilis</i> KF255983	99	CP002468	<i>Bacillus subtilis</i> KF313554
A2	+	rod/ barra	JX123316	100	<i>Bacillus subtilis</i> KF255984	99	CP003329	<i>Bacillus subtilis</i> KF313555
A3	+	rod/ barra	KC519442	100	<i>Bacillus mojavensis</i> KF255985	99	AY197618	<i>Bacillus mojavensis</i> KF313556
A4	+	rod/ barra	KC519442	100	<i>Bacillus mojavensis</i> KF255986	99	AY197618	<i>Bacillus mojavensis</i> KF313557
A5	+	rod/ barra	JX126863	100	<i>Bacillus mojavensis</i> KF255987	99	AY197618	<i>Bacillus mojavensis</i> KF313558
A6	+	rod/ barra	KC683724	100	<i>Bacillus thuringiensis</i> KF255988	--	--	--
A7	-	rod/ barra	KC787580	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KF255989	--	--	--
A8	+	rod/ barra	KC692184	100	<i>Bacillus thuringiensis</i> KF255990	--	--	--

Positive reaction (+) and negative reaction (-). Samples not analyzed (-)

Reacción positiva (+) y reacción negativa (-). Muestras no analizadas (-)

contained *P. aeruginosa* (Figure 1). To separate and corroborate the identification of the two *Bacillus* species in cluster 1, *sodA* sequence analyses were carried out on the A1-A5 isolates. The *sodA* tree clearly defined two different clusters: cluster 1 containing A1 and A2 (*B. subtilis*) and cluster 2 containing A3, A4 and A5 (*B. mojavensis*) (Figure 2).

Antifungal compounds produced by bacterial strains

The eight strains were tested to determine their biocontrol activity (Table 3). The results demonstrated different behaviour of each bacterial species, with

100 % con las cepas *B. mojavensis* KC519442 (A3 y A4) y JX126863 (A5). A6 y A8 se identificaron como dos cepas distintas de *B. thuringiensis* (100 % de identidad con *B. thuringiensis* KC683724 y KC692184, respectivamente); además, el análisis de PCR demostró que ambas cepas de *B. thuringiensis* contenían genes *cry*. La identificación taxonómica de la cepa A7 se confirmó con una identidad del 100 % con la secuencia ARNr 16S de la cepa *P. aeruginosa* KC787580. Asimismo, las secuencias de nucleótidos *sodA* de A1 y A2 resultaron ser 99 % idénticas al gen *sodA* de las cepas *B. subtilis* CP002468 y CP003329, respectivamente. Las cepas A3, A4 y A5 fueron 99 % idénticas al gen *sodA* de la cepa *B. mojavensis* AY197618. Los números de acceso obtenidos en este

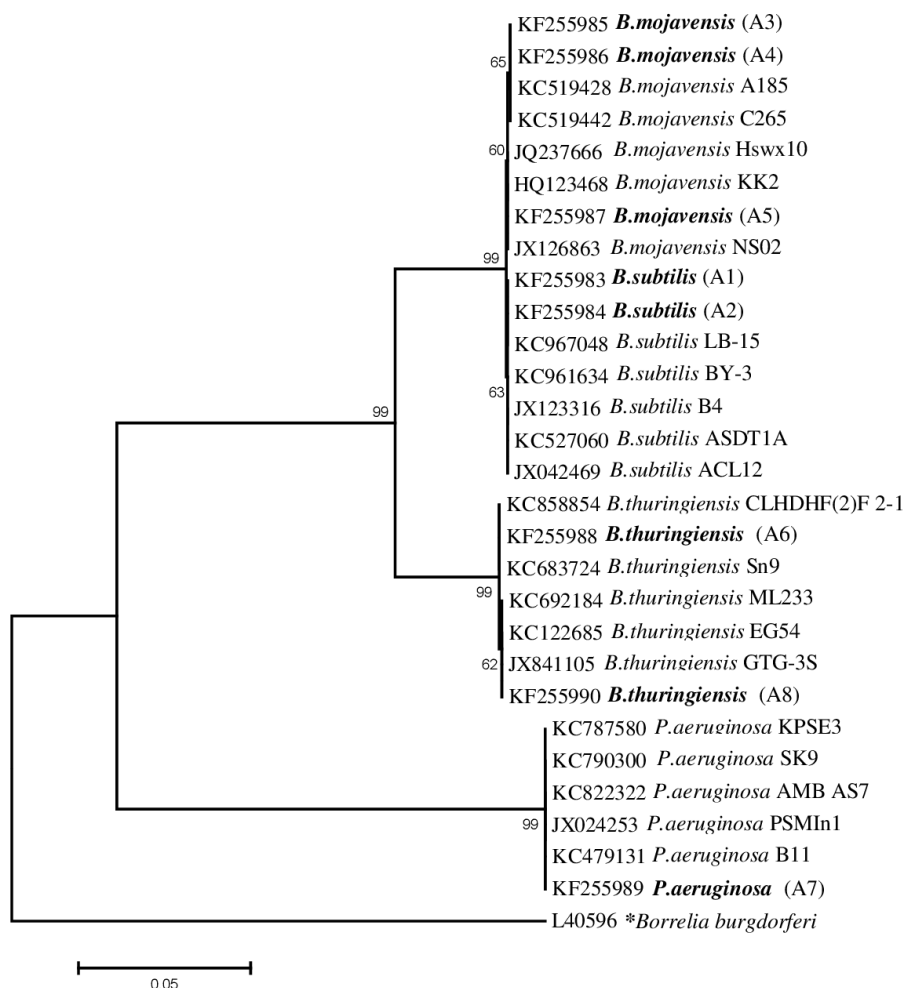


Figure 1. Phylogenetic tree using the 16S rRNA gene nucleotide sequences of eight bacterial isolates (letters bold: *Bacillus mojavensis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, and *Pseudomonas aeruginosa*) from rhizospheric soil of *Jatropha curcas*. *Borrelia burgdorferi* (L40596) was included as an outgroup. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method with 1 000 bootstrap replications. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

Figura 1. Árbol filogenético que utiliza las secuencias de nucleótidos del gen ARNr 16S de ocho cepas bacterianas (letras en negrita: *Bacillus mojavensis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*) provenientes del suelo rizosférico de *Jatropha curcas*. *Borrelia burgdorferi* (L40596) se incluyó como grupo externo. El árbol se construyó utilizando el método Neighbor-Joining con 1 000 réplicas de *bootstrap*. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótidos.

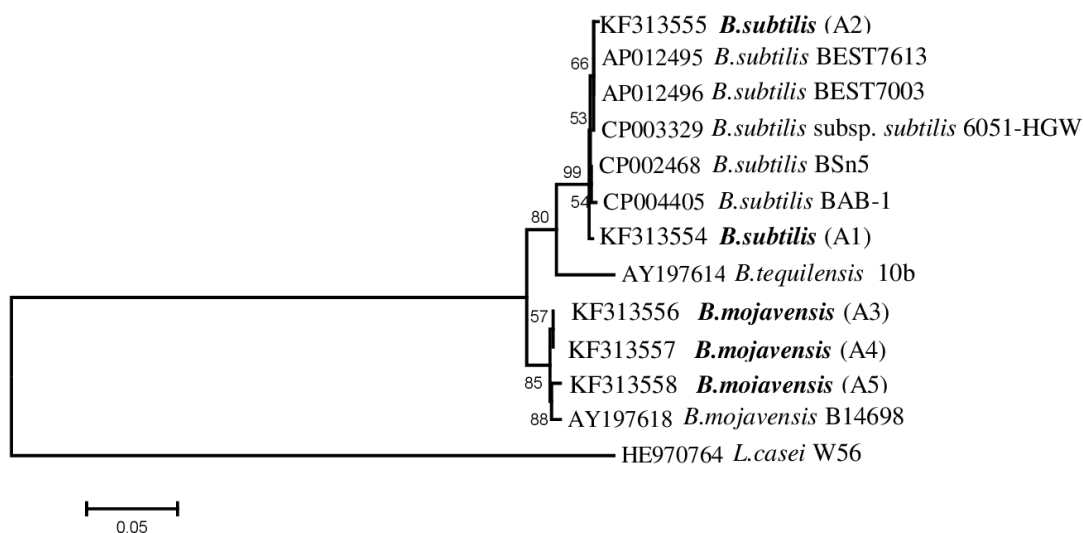


Figure 2. Phylogenetic tree based on *sodA* gene sequences of five bacterial isolates (bold type: *Bacillus mojavensis* and *B. subtilis*) from rhizospheric soil of *Jatropha curcas*. **Lactobacillus casei* (HE970764) was included as an outgroup. The tree was constructed using the neighbor-joining method with 1 000 bootstrap replications. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

Figura 2. Árbol filogenético basado en secuencias del gen *sodA* de cinco cepas bacterianas (tipo negrita: *Bacillus mojavensis* y *B. subtilis*) del suelo rizosférico de *Jatropha curcas*. **Lactobacillus casei* (HE970764) se incluyó como grupo externo. El árbol se construyó usando el método Neighbor-Joining con 1 000 réplicas de *bootstrap*. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de nucleótidos.

Table 3. Bacterial isolates from rhizospheric soil of *Jatropha curcas*: characterization of compounds with biological control and plant growth promotion potential.

Cuadro 3. Cepas bacterianas provenientes de suelo rizosférico de *Jatropha curcas*: caracterización de compuestos con potencial en control biológico y promoción de crecimiento de plantas.

Strains/ Cepas	Biological control/ Control biológico				Plant growth promotion/ Promoción de crecimiento de plantas	
	Proteases/ Proteasas	Chitinases/ Quitinasas	Siderophores/ Sideróforos	HCN	Phosphate solubilization/ Solubilización de fosfatos	IAA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
<i>Bacillus subtilis</i> (A1)	+	-	+	-	-	4.85 \pm 0.004 c
<i>Bacillus subtilis</i> (A2)	+	-	+	-	-	5.06 \pm 0.006 c
<i>Bacillus mojavensis</i> (A3)	+	-	+	-	-	4.30 \pm 0.003 c
<i>Bacillus mojavensis</i> (A4)	+	-	+	-	-	4.35 \pm 0.010 c
<i>Bacillus mojavensis</i> (A5)	+	-	+	-	-	4.55 \pm 0.006 c
<i>Bacillus thuringiensis</i> (A6)	+	+	-	-	-	15.31 \pm 0.054 b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (A7)	-	-	+	+	+	18.73 \pm 0.001 a
<i>Bacillus thuringiensis</i> (A8)	+	+	-	-	-	10.56 \pm 0.068 c

Presence (+) or absence (-) of the compound is indicated for all substances except indole-3-acetic acid (IAA), where mean \pm standard deviation of concentration is shown. HCN: hydrogen cyanide. Different letters within columns indicate significant differences at $P < 0.05$, according to the Tukey test.

La presencia (+) o ausencia (-) del compuesto está indicada para todas las sustancias excepto en el ácido indol-3-acético (IAA), donde se muestra la media \pm desviación estándar de la concentración. HCN: cianuro de hidrógeno. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

all strains having some degree of antagonistic effect in the mycelial growth of *C. lunata* and *F. equiseti*. All *Bacillus* spp. produced hydrolytic enzymes. Protease activity was detected in *B. subtilis*, *B. mojavensis* and *B. thuringiensis*, while chitinase activity was only observed in *B. thuringiensis* strains (A6 and A8). All strains except *B. thuringiensis* produced siderophores. Only *P. aeruginosa* produced HCN (Table 3).

Phosphate solubilization and quantification of indole-3-acetic acid in bacterial strains

The phosphate solubilization and IAA production abilities of different bacterial strains are shown in Table 3. Among the eight strains evaluated, only *P. aeruginosa* showed phosphate solubilization activity, but all strains tested produced IAA. While most of the isolates produced similar levels of IAA, *P. aeruginosa* (A8, 18.73 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and *B. thuringiensis* (A6, 15.31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) had significantly higher IAA production than the remaining isolates.

Germination evaluation and plant growth-promoting activity

Germination percentage was recorded 15 days after planting. The negative control showed the lowest percentage germination, followed by the strains of *B. mojavensis* (A5, A3) and *B. subtilis* (A2) with around 50 to 60 percent germination. The strains *B. subtilis* (A1), *B. mojavensis* (A4) and *B. thuringiensis* (A6) showed the highest germination with between 80 and 88 % (Table 4).

estudio a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes ARNr 16S y *sodA* se muestran en el Cuadro 2.

Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos construidos a partir de las secuencias ARNr 16S y *sodA* se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. El árbol ARNr 16S mostró tres grupos distintos: grupo 1 con cepas de *B. mojavensis* y *B. subtilis*, grupo 2 con *B. thuringiensis* y grupo 3 con *P. aeruginosa* (Figura 1). Para separar y corroborar la identificación de las dos especies de *Bacillus* en el grupo 1, se realizaron análisis de las secuencias de *sodA* en las cepas A1-A5. El árbol *sodA* definió claramente dos grupos: grupo 1 con A1 y A2 (*B. subtilis*) y grupo 2 con A3, A4 y A5 (*B. mojavensis*) (Figura 2).

Compuestos antimicóticos producidos por cepas bacterianas

Las ocho cepas se examinaron para determinar su actividad de biocontrol (Cuadro 3). Los resultados demostraron que cada especie bacteriana tuvo comportamiento diferente y algún grado de efecto antagónico en el crecimiento del micelio de *C. lunata* y *F. equiseti*. Todas las cepas de *Bacillus* spp. produjeron enzimas hidrolíticas. Se detectó actividad de proteasas en *B. subtilis*, *B. mojavensis* y *B. thuringiensis*, mientras que la actividad de quitinasas solo se observó en *B. thuringiensis* (A6 y A8). A excepción de *B. thuringiensis*, todas las cepas produjeron sideróforos y solo *P. aeruginosa* produjo HCN (Cuadro 3).

Table 4. *Bacillus* strains treatments inoculated on tomato seeds to evaluated germination and plant growth promotion. Cuadro 4. Tratamientos con cepas de *Bacillus* inoculados en semillas de jitomate para evaluar la germinación y promoción del crecimiento en plantas.

Strain/ Cepa	Germination (%)/ Germinación (%)	Plant length (cm)/ Longitud de planta (cm)	Stem diameter (mm)/ Diámetro de tallo (mm)	Leaf number/ Número de hojas	Plant fresh weight (g)/ Peso fresco de planta (g)	Root fresh weight (g)/ Peso fresco de raíz (g)
A1	86.67 ± 2.89 a	16.94 ± 0.71 ab	5.00 ± 0.51 a	7.00 ± 0.57 a	6.29 ± 1.41 ab	1.05 ± 0.46 a
A2	61.67 ± 2.89 dc	15.34 ± 0.69 bc	4.15 ± 0.33 ab	6.42 ± 0.97 ab	4.27 ± 1.50 bc	0.77 ± 0.47 a
A3	58.33 ± 7.64 dc	15.18 ± 1.55 bc	4.52 ± 0.48 ab	6.85 ± 0.90 a	4.95 ± 1.43 ac	0.76 ± 0.23 a
A4	81.67 ± 2.89 ab	19.81 ± 2.10 a	4.77 ± 0.61 ab	7.42 ± 0.78 a	7.93 ± 1.21 a	1.21 ± 0.21 a
A5	53.33 ± 5.77 d	15.35 ± 2.86 bc	4.58 ± 0.50 ab	6.85 ± 0.69 a	5.77 ± 2.08 ac	0.87 ± 0.40 a
A6	88.33 ± 2.89 a	15.44 ± 1.41 b	4.98 ± 0.59 a	6.42 ± 0.53 ab	6.55 ± 2.41 ab	1.02 ± 0.61 a
A8	70.00 ± 5.00 bc	14.07 ± 1.73 bc	4.34 ± 0.68 ab	6.85 ± 0.37 a	5.20 ± 1.53 ac	0.86 ± 0.27 a
NTF	NA	12.14 ± 2.73 c	3.76 ± 1.08 b	5.57 ± 0.78 bc	3.51 ± 1.90 c	0.61 ± 0.34 ab
NC/TN	50 ± 5.00 d	8.37 ± 2.07 d	2.58 ± 0.43 c	5.00 ± 0.57 c	1.39 ± 0.74 d	0.24 ± 0.13 b

*NTF = nitrofoska fertilizer; CN = negative control; NA = not apply. Different letters within columns indicate significant differences at $P < 0.05$, according to the Tukey test.

*NTF = fertilizante nitrofoska; TN = testigo negativo; NA = no aplica. Letras diferentes dentro de las columnas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Growth promotion by the isolated strains was evaluated using size variables, which differed slightly in their results. In the plant length variable, the strains *B. mojavensis* (A4), *B. subtilis* (A1), and *B. thuringiensis* (A6) showed statistically significant differences ($P < 0.05$) with between 15.4 and 19.8 cm, followed by *B. mojavensis* (A3, A5), *B. subtilis* (A2) and *B. thuringiensis* (A8) with 14.0 to 15.3 cm. These latter strains did not differ significantly ($P > 0.05$) from the positive control according to the Tukey test (Table 4). In the stem diameter, the strains *B. subtilis* (A1) and *B. thuringiensis* (A6) had the largest stems, with 5 and 4.98 mm, respectively. Although the other strains also had larger stem diameters than the positive control, the Tukey test did not show significant differences ($P > 0.05$) (Table 4). For the number of leaves, treatments with the bacteria *B. subtilis* (A1), *B. mojavensis* (A3, A4, A5) and *B. thuringiensis* (A8) had up to two leaves more than the positive control (Table 4). In terms of the plant's fresh weight, *B. mojavensis* (A4), *B. thuringiensis* (A6) and *B. subtilis* (A1) had the best results. Finally, according to the Tukey test fresh root weight did not differ significantly ($P > 0.05$) between treatments and positive control. For all tests, the smallest sizes and weights occurred in plants from the negative control group (without treatment) (Table 4).

Discussion

There are few scientific reports on the isolation, identification, and characterization of microbial communities of *J. curcas*. A previous report revealed that the rhizosphere of this perennial crop contains rich microbial biodiversity and demonstrated the importance of obtaining PGPR isolates to understand their ecological and social impact (Jha, Patel, Rajendran, & Saraf, 2010). It is therefore essential to evaluate the functional potential of the isolates obtained from *J. curcas* crops. In this study, eight rhizobacteria isolates showed antagonistic activity against *C. lumata* and *F. equiseti*, phytopathogenic fungi of *J. curcas* seeds. This antifungal effect on the mycelial growth of the two fungal species was demonstrated by the presence of the volatile and diffusible compounds produced by the bacterial isolates.

Morphological and molecular identification showed that these antagonistic bacteria belong to the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera. The phylogenetic trees showed distinct clusters that contain different *Bacillus* species (*B. mojavensis*, *B. subtilis* and *B. thuringiensis*) and one strain of *P. aeruginosa*. The work of Wong-Villarreal et al. (2019) reported various strains of *P. aeruginosa*, bacteria with biotechnological potential isolated from the *J. curcas* rhizosphere. In that study, different strains of *P. aeruginosa* were able to degrade aromatic

Solubilización de fosfatos y cuantificación del ácido indol-3-acético en cepas bacterianas

La capacidad de solubilización de fosfatos y de producción de IAA de las cepas bacterianas se muestra en el Cuadro 3. De las ocho cepas evaluadas, solo *P. aeruginosa* mostró actividad de solubilización de fosfatos, pero todas las cepas analizadas produjeron IAA. Mientras que la mayoría de las cepas produjeron niveles similares de IAA, *P. aeruginosa* (A8, 18.73 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y *B. thuringiensis* (A6, 15.31 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) tuvieron una producción de IAA significativamente mayor que las demás cepas.

Evaluación de la germinación y actividad promotora del crecimiento de las plantas

El porcentaje de germinación se registró 15 días después de la siembra. El testigo negativo mostró el menor porcentaje, seguido por las cepas *B. mojavensis* (A5, A3) y *B. subtilis* (A2) con alrededor de 50 a 60 % de germinación. Por su parte, las cepas *B. subtilis* (A1), *B. mojavensis* (A4) y *B. thuringiensis* (A6) mostraron el mayor porcentaje de germinación que se registró entre 80 y 88 % (Cuadro 4).

La promoción de crecimiento por las cepas aisladas se evaluó utilizando diferentes variables de tamaño, las cuales difirieron ligeramente en sus resultados. En la variable de longitud de planta, las cepas *B. mojavensis* (A4), *B. subtilis* (A1) y *B. thuringiensis* (A6) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con entre 15.4 y 19.8 cm, seguidas por *B. mojavensis* (A3, A5), *B. subtilis* (A2) y *B. thuringiensis* (A8) con 14.0 a 15.3 cm. Estas últimas cepas no presentaron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) con respecto al testigo positivo (tratamiento fertilizado) según la prueba de Tukey (Cuadro 4). En el diámetro del tallo, las cepas *B. subtilis* (A1) y *B. thuringiensis* (A6) tuvieron los tallos más grandes, con 5 y 4.98 mm, respectivamente. Aunque las otras cepas también tuvieron diámetros de tallo más grandes que el testigo positivo, la prueba de Tukey no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 4). En cuanto al número de hojas, los tratamientos con las bacterias *B. subtilis* (A1), *B. mojavensis* (A3, A4, A5) y *B. thuringiensis* (A8) tuvieron hasta dos hojas más que el testigo positivo (Cuadro 4). En cuanto al peso fresco de la planta, *B. mojavensis* (A4), *B. thuringiensis* (A6) y *B. subtilis* (A1) obtuvieron los mejores resultados. Por último, según la prueba de Tukey, el peso fresco de raíz no presentó diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos y testigo positivo. En todas las pruebas, los tamaños y pesos más pequeños se produjeron en las plantas del grupo del testigo negativo (sin tratamiento) (Cuadro 4).

hydrocarbons and promoted growth in *Zea mays* L. Although the centre of origin and domestication of *J. curcas* is Mexico (Mazumdar et al., 2018), the potential of its rhizospheric bacteria is little known. Considering the incidence of pests and diseases reported in *J. curcas* (Góngora-Canul et al., 2018; Saragih, Fajri, Mahmudy, Abadi, & Anggodo, 2018), it is important to evaluate the potential for biological control and plant growth promotion by rhizobacteria strains.

In this study, the antagonistic rhizobacteria demonstrated their ability to produce antifungal metabolites. *B. subtilis* strains produced proteases and siderophores, and they had substantial antagonistic activity against the mycelial growth of *C. lunata* and *F. equiseti*. The results are consistent with those reported in studies carried out with *B. subtilis* isolated from *J. curcas* in India and Mexico (Hernández-Guerra et al., 2016; Latha et al., 2011), which produced siderophores and inhibited mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium verticillioides*. The *B. mojavensis* strains isolated here also produced proteases and siderophores and inhibited the mycelial growth of the two fungal species tested. In previous studies, *B. mojavensis* inhibited the mycelial growth of three important phytopathogenic fungi: *Ceratocystis fimbriata*, *Pestalotiopsis microspora* and *F. verticillioides* (Hernández-Guerra et al., 2016; Mohamad et al., 2018). Another significant bacterial species isolated in this study was *B. thuringiensis*. This strain produced hydrolytic enzymes such as proteases and chitinases and had *cry* genes, essential for the biocontrol of insect pests. The chitinase activity of *B. thuringiensis* and its antifungal effect against phytopathogenic fungi have been previously demonstrated (Martínez-Zavala, Barboza-Pérez, Hernández-Guzmán, Bideshi, & Barboza-Corona, 2020). Finally, we isolated a strain of *P. aeruginosa*, which was the isolate with the strongest antagonistic effect on the mycelial growth of two fungal species tested. It (along with other isolates from this study) produced siderophores and was the only rhizobacterium that produced HCN. HCN is a secondary metabolite that acts as an inhibitor of cytochrome c oxidase, and *P. aeruginosa* contributes to the suppression of plant diseases by HCN production (Abo-Elyousr et al., 2019).

Currently, rhizobacteria are known to be efficient biofertilizers in different crops, providing phytohormones like auxin, cytokinin, gibberellin, and ACC deaminase, in addition to providing nutrients by nitrogen fixation, phosphorus solubilization, and sequestration of iron by the production of siderophores. On the one other hand, the plants' roots provide essential molecules for bacteria metabolism such as sugars, organic acids, and amino acids (Olanrewaju, Glick, & Babalola, 2017). All of the strains analysed in this study can produce IAA. Numerous reports have indicated that IAA production is related to plant growth

Discusión

Existen pocos reportes científicos sobre el aislamiento, identificación y caracterización de las comunidades microbianas de *J. curcas*. Un reporte anterior reveló que la rizosfera de este cultivo perenne contiene gran biodiversidad microbiana y demostró la importancia de obtener aislamientos de PGPR para comprender su impacto ecológico y social (Jha, Patel, Rajendran, & Saraf, 2010). Por tanto, es esencial evaluar el potencial funcional de las cepas obtenidas de los cultivos de *J. curcas*. En este estudio, ocho cepas de rizobacterias mostraron actividad antagónica frente a *C. lunata* y *F. equiseti*, hongos fitopatógenos de semillas de *J. curcas*. Este efecto antifúngico en el crecimiento de micelios de dos especies de hongos quedó demostrado por la presencia de compuestos volátiles y difusibles producidos por los aislamientos bacterianos.

La identificación morfológica y molecular demostró que estas bacterias antagonistas pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Los árboles filogenéticos mostraron distintos grupos que contienen especies de *Bacillus* (*B. mojavensis*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis*) y una cepa de *P. aeruginosa*. En los estudios de Wong-Villarreal et al. (2019) se reportaron varias cepas de *P. aeruginosa*, bacterias con potencial biotecnológico aisladas de la rizosfera de *J. curcas*. En ese estudio, las cepas de *P. aeruginosa* fueron capaces de degradar hidrocarburos aromáticos y promover el crecimiento en *Zea mays* L. Aunque el centro de origen y domesticación de *J. curcas* es México (Mazumdar et al., 2018), el potencial de sus bacterias rizosféricas es poco conocido. Teniendo en cuenta la incidencia de plagas y enfermedades reportadas en *J. curcas* (Góngora-Canul et al., 2018; Saragih, Fajri, Mahmudy, Abadi, & Anggodo, 2018), es importante evaluar el potencial de control biológico y promoción del crecimiento de plantas por cepas de rizobacterias.

En este estudio, las rizobacterias antagonistas demostraron su capacidad para producir metabolitos antifúngicos. Las cepas *B. subtilis* produjeron proteasas y sideróforos, y tuvieron una actividad antagónica sustancial frente al crecimiento micelial de *C. lunata* y *F. equiseti*. Los resultados son consistentes con los reportados en estudios realizados con *B. subtilis*, aislado de *J. curcas* en India y México (Hernández-Guerra et al., 2016; Latha et al., 2011), que produjeron sideróforos e inhibieron el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Fusarium verticillioides*. Las cepas *B. mojavensis* aisladas en el presente trabajo también produjeron proteasas y sideróforos e inhibieron el crecimiento micelial de las dos especies de hongos analizadas. En estudios anteriores, *B. mojavensis* inhibió el crecimiento micelial de tres hongos fitopatógenos importantes: *Ceratocystis fimbriata*, *Pestalotiopsis microspora* y *F. verticillioides*

stimulation by *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., among other microorganisms (Jha & Saraf, 2012; Uzair et al., 2018). Previous studies have indicated that *Bacillus* spp. and *Enterobacter cancerogenus* can enhance the growth of *J. curcas* (Desai et al., 2007; Jha et al., 2012). Here, only *P. aeruginosa* showed phosphate solubilization activity and this species exhibited the highest beneficial potential. It has been reported that *P. aeruginosa* solubilizes phosphates significantly and produces IAA, siderophores, and HCN and that it can be used as a bioinoculant to increase productivity of legumes (Ahemad & Khan, 2012). Currently, there are few works about the bacteria *B. subtilis*, *B. thuringiensis* and *B. mojavensis* as promoters of the growth on tomato plants and germination inductors. The study by Cabra-Cendales, Rodríguez-González, Villota-Cuasquer, Tapasco-Alzate, and Hernández-Rodríguez (2017) demonstrated that one strain of *B. subtilis* induced the germination of around 86.7 % of tomato seeds, however, it did not include statistical comparisons with uninoculated seeds. In this study the germination percentage of all strains showed statistically significant differences compared to the negative control (uninoculated seeds had 50 % germination). The study of Cabra-Cendales et al. (2017) coincides with our results; in both studies the bacteria increased the stem measurements as well as fresh mass. Qi, Aiuchi, Tani, Asano, and Koike (2016) tested the promotion growth activity of *B. thuringiensis* on tomato plants and seed germination and found larger stem length and plant fresh weight compared to an untreated control, and the strains promoted tomato seed germination. On the other hand, *B. mojavensis* has no previous reports of growth promoting effects in tomato plants, though the study by Pyo, Shrestha, Park, and Kang (2014) demonstrated the potential promotion growth activity of one strain of *B. mojavensis* by spraying bacterial suspension on the leaves of altari radish and lettuce. The foliar treatments increased the quantity, length, and weight of leaves and roots in both altari radish and lettuce crops.

Nowadays, it is known the pollution caused by the excessive usage of synthetic products in the agricultural activity, which decrease the quality of water and soil. Furthermore, these products affect the human health, which is why the application of pesticides in relation to their harmful effects is a matter of concern worldwide (Leong et al., 2020). In this regard, Mexico is the largest producer of tomatoes in the world and the possible use of PGPB may be an option to reduce the consumption of chemicals. Studies using PGPB have shown them to be an alternative as biofertilizers and disease suppressants, which can be more environmentally friendly than chemicals. Overall, in this study it was demonstrated that several of the rhizobacteria of *J. curcas* produce compounds of potential importance for biological control of pests and diseases and improvement of plant growth.

(Hernández-Guerra et al., 2016; Mohamad et al., 2018). Otra especie bacteriana importante aislada en este estudio fue *B. thuringiensis*. Esta cepa produjo enzimas hidrolíticas como proteasas y quitinasas y presentó genes *cry*, esenciales para el biocontrol de plagas de insectos. La actividad quitinasa de *B. thuringiensis* y su efecto antifúngico frente a hongos fitopatógenos ha sido demostrado previamente (Martínez-Zavala, Barboza-Pérez, Hernández-Guzmán, Bideshi, & Barboza-Corona, 2020). Finalmente, se aisló una cepa de *P. aeruginosa*, que fue la de mayor efecto antagónico sobre el crecimiento micelial de las dos especies fúngicas analizadas. Esta cepa (junto con otras de este estudio) produjo sideróforos y fue la única rizobacteria que produjo HCN. El HCN es un metabolito secundario que actúa como inhibidor de la enzima citocromo c oxidasa, y *P. aeruginosa* contribuye a la supresión de enfermedades de plantas mediante la producción de HCN (Abo-Elyousr et al., 2019).

Actualmente, se sabe que las rizobacterias son biofertilizantes eficaces en varios cultivos, proporcionando fitohormonas como la auxina, citoquinina, giberelina y ACC desaminasa; además, aportan nutrientes mediante la fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo y secuestro del hierro mediante la producción de sideróforos. Por otro lado, las raíces de las plantas proporcionan moléculas esenciales para el metabolismo de las bacterias, como azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Olanrewaju, Glick, & Babalola, 2017). Todas las cepas analizadas en este estudio pueden producir IAA. Muchos estudios señalan que la producción de IAA se relaciona con la estimulación del crecimiento en plantas por *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., entre otros microorganismos (Jha & Saraf, 2012; Uzair et al., 2018). Otros estudios indican que *Bacillus* spp. y *Enterobacter cancerogenus* pueden potenciar el crecimiento de *J. curcas* (Desai et al., 2007; Jha et al., 2012). En este caso, solo *P. aeruginosa* mostró actividad de solubilización de fosfatos y exhibió el mayor potencial beneficioso. Se ha reportado que *P. aeruginosa* solubiliza los fosfatos de forma significativa y produce IAA, sideróforos y HCN y que puede utilizarse como bioinoculante para aumentar la productividad de legumbres (Ahemad & Khan, 2012). Actualmente, existen pocos estudios sobre las bacterias *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. mojavensis* como promotoras del crecimiento en plantas de jitomate e inductoras de la germinación. El estudio de Cabra-Cendales, Rodríguez-González, Villota-Cuasquer, Tapasco-Alzate, y Hernández-Rodríguez (2017) demostró que una cepa de *B. subtilis* indujo la germinación de alrededor de 86.7 % de semillas de jitomate; sin embargo, no incluyó comparaciones estadísticas con semillas no inoculadas. En el presente estudio, el porcentaje de germinación de todas las cepas mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con el testigo negativo (las semillas no inoculadas tuvieron 50 % de germinación). El estudio de Cabra-Cendales et al. (2017) coincide con

Conclusions

Eight strains of rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of *Jatropha curcas* showed antagonistic activity against *Curvularia lunata* and *Fusarium equiseti* by the effects of the volatile and diffusible compounds. The rhizobacteria *Bacillus mojavensis*, *B. thuringiensis*, and *Pseudomonas aeruginosa* can suppress mycelial growth by production of antifungal compounds, indicating their potential in biocontrol against diseases of *J. curcas*. In addition, to our knowledge, this is the first report of rhizobacteria isolated of *J. curcas* that demonstrated their capacity to improve the germination seeds and promote growth of tomato plants.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Instituto Politécnico Nacional (IPN) of México for funding support. Erubiel Toledo-Hernández is very grateful to Dr. Miguel Gerardo Velázquez-del Valle and Dr. Ana Niurka Hernández-Lauzardo for their support to publish this article.

End of English version

References / Referencias

- Abo-Elyousr, K. A. M., Khalil Bagy, H. M. M., Hashem, M., Alamri, S. A. M., & Mostafa, Y. S. (2019). Biological control of the tomato wilt caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using formulated plant growth-promoting bacteria. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29, 54. doi: 10.1186/s41938-019-0152-6
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(4), 451–459. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.06.003
- Anjorin, S. T., Omolewa, O. R., & Salako, E. A. (2011). Germinability and seedling vigour of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds inoculated with seed-borne fungi. *African Journal of Agricultural Research*, 6(12), 2655–2659. doi: 08.5897/AJAR09.480
- Baakza, A., Vala, A. K., Dave, B. P., & Dube, H. C. (2004). A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 311(1), 1–9. doi: 10.1016/j.jembe.2003.12.028
- Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sinai, R., Manasherob, R., ... Margalith, Y. (1997). Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4883–4890. doi: 10.1128/aem.63.12.4883-4890.1997
- Cabra-Cendales, T., Rodríguez-González, C. A., Villota-Cuásquer, C. P., Tapasco-Alzate, O. A., & Hernández-Rodríguez, A. (2021). Rhizobacteria isolated from *Jatropha curcas* rhizospheric soil showed antagonistic activity against *Curvularia lunata* and *Fusarium equiseti* by the effects of the volatile and diffusible compounds. *Journal of Agricultural Science*, 157(1), 1–10. doi: 10.1017/S0021859621000000
- Qi, Aiuchi, Tani, Asano, y Koike (2016) evaluaron la actividad promotora del crecimiento de *B. thuringiensis* en plantas de jitomate y la germinación de semillas, y encontraron mayor longitud del tallo y peso fresco de la planta en comparación con un testigo no tratado; así también, las cepas promovieron la germinación de semillas de jitomate. Por otro lado, *B. mojavensis* no cuenta con reportes anteriores sobre los efectos de promoción de crecimiento en plantas de jitomate. No obstante, el estudio de Pyo, Shrestha, Park, y Kang (2014) demostró la potencial actividad promotora de crecimiento de una cepa de *B. mojavensis* mediante la pulverización de la suspensión bacteriana en hojas de rábano altari y lechuga; los tratamientos foliares aumentaron la cantidad, la longitud y el peso de las hojas y raíces de dichos cultivos.
- En la actualidad se conoce la contaminación causada por el uso excesivo de productos sintéticos en la actividad agrícola, los cuales disminuyen la calidad del agua y suelo; además, afectan la salud humana, por lo que la aplicación de plaguicidas en relación con sus efectos nocivos es un tema preocupante a nivel mundial (Leong et al., 2020). En este sentido, México es el mayor productor de jitomate del mundo y el posible uso de PGPR puede ser una opción para disminuir el consumo de productos químicos. Los estudios que emplean PGPR han demostrado ser una alternativa como biofertilizantes y supresores de enfermedades, que pueden ser más amigables con el medio ambiente que los productos químicos. En general, en este estudio se demostró que varias de las rizobacterias de *J. curcas* producen compuestos de importancia potencial para el control biológico de plagas y enfermedades y la mejora del crecimiento de las plantas.

Conclusiones

Ocho aislados de rizobacterias provenientes del suelo rizosférico de *Jatropha curcas* mostraron actividad antagónica frente a *Curvularia lunata* y *Fusarium equiseti* por los efectos de compuestos volátiles y difusibles. Las rizobacterias *Bacillus mojavensis*, *B. thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa* pueden suprimir el crecimiento de los micelios mediante la producción de compuestos antimicóticos, lo que indica su potencial en el control biológico contra enfermedades de *J. curcas*. Al respecto, hasta donde se sabe, este es el primer reporte de rizobacterias aisladas de *J. curcas* que demostraron capacidad para mejorar la germinación de semillas y promover el crecimiento de las plantas de jitomate.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por su apoyo financiero. Erubiel Toledo-Hernández

- (2017). *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 37–44. doi: 10.15446/abc.v22n1.57375
- Cerón, J., Ortíz, A., Quintero, R., Guereca, L., & Bravo, A. (1995). Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), 3826–3831. doi: 10.1128/aem.61.11.3826-3831.1995
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., & Lumyong, S. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *ScienceAsia*, 28, 241–245. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.241
- Desai, S., Narayanaiah, C., Kumari, C. K., Reddy, M. S., Gnanamanickam, S. S., Rao, G. R., & Venkateswarlu, B. (2007). Seed inoculation with *Bacillus* spp. improves seedling vigour in oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Biology and Fertility of Soils*, 44, 229–234. doi: 10.1007/s00374-007-0209-7
- Dharmaputra, O. S., Worang, R. L., Syarief, R., & Miftahudin. (2009). The quality of physic nut (*Jatropha curcas*) seeds affected by water activity and duration of storage. *Microbiology Indonesia*, 3(3), 139–145. doi: 10.5454/mi.3.3.6
- Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, M. E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1475–1484. doi: 10.1099/ijs.0.63946-0
- Góngora-Canul, C. C., Martínez-Sebastián, G., Aguilera-Cauich, E. A., Uc-Varguez, A., López-Puc, G., & Pérez-Hernández, O. (2018). Spatio-temporal dynamics of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) populations in plantations of *Jatropha curcas* L. in Yucatan, Mexico. *Industrial Crops and Products*, 117, 110–117. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.12.070
- Hernández-Guerra, H., Castrejón-Gómez, V. R., Velázquez-del Valle, M. G., Figueroa-Brito, R., Castrejón-Ayala, F., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2016). Activity of rhizobacteria of *Jatropha curcas* against *Fusarium verticillioides* and *Leptoglossus zonatus*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(3), 255–268. doi: 10.5154/r.rchscfa.2015.05.024
- Jha, C. K., Patel, D., Rajendran, N., & Saraf, M. (2010). Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *Journal of Basic Microbiology*, 50(3), 211–217. doi: 10.1002/jobm.200900272
- Jha, C. K., Patel, B., & 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
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2012). Evaluation of multispecies plant-growth-promoting consortia for the growth promotion of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31, 588–598. doi: 10.1007/s00344-012-9269-5
- Karimi, K., Amini, J., Harighi, B., & Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian Agracadece al Dr. Miguel Gerardo Velázquez-del Valle y a la Dra. Ana Niurka Hernández-Lauzardo por su apoyo para publicar este artículo.*

Fin de la versión en español

Journal of Crop Science, 6(4), 695–703. Retrieved from <https://www.cabi.org/isc/FullTextPDF/2012/20123167040.pdf>

- Kenení, Y. G., Hvoslef-Eide, A. K., & Marchetti, J. M. (2019). Mathematical modelling of the drying kinetics of *Jatropha curcas* L. seeds. *Industrial Crops and Products*, 132, 12–20. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.02.012
- 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
- Leong, W. H., Teh, S. Y., Hossain, M. M., Nadarajaw, T., Zabidi-Hussin, Z., Chin, S. Y., ... Lim, S. H. E. (2020). Application, monitoring and adverse effects in pesticide use: the importance of reinforcement of good agricultural practices (GAPs). *Journal of Environmental Management*, 260, 109987. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109987
- Martínez-Zavala, S. A., Barboza-Pérez, U. E., Hernández-Guzmán, G., Bideshi, D. K., & Barboza-Corona, J. E. (2020). Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: phylogeny, modular structure, and applied potentials. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3032. doi: 10.3389/fmicb.2019.03032
- Mazumdar, P., Singh, P., Babu, S., Siva, R., & Harikrishna, J. A. (2018). An update on biological advancement of *Jatropha curcas* L.: New insight and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 903–917. doi: 10.1016/j.rser.2018.04.082
- Mohamad, O. A. A., Li, L., Ma, J. B., Hatab, S., Xu, L., Guo, J. W., ... Li, W. J. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 924. doi: 10.3389/fmicb.2018.00924
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2020). BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Retrieved from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 197. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9
- Oluwatoyin, F. I., & Anthony, E. A. (2019). The effect of *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina* on the proximate composition of *Jatropha curcas* seed a biofuel plant. *Journal of Biotechnology and Biomedicine*, 2, 001-008. doi: 10.26502/jbb.2642-9128004

- Pabón-Baquero, D., Velázquez-del Valle, M. G., Evangelista-Lozano, S., León-Rodríguez, R., & Hernández-Lauzardo, A. N. (2015). Chitosan effects on phytopathogenic fungi and seed germination of *Jatropha curcas* L. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 21(3), 241–253. doi: 10.5154/r.rchscfa.2014.10.051
- Pyo, J. S., Shrestha, S. A., Park, S. H., & Kang, J. S. (2014). Biological control of plant growth using the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus mojavensis* KJS-3. *Journal of Life Science*, 24(12), 1308–1315. doi: 10.5352/jls.2014.24.12.1308
- Qi, J., Aiuchi, D., Tani, M., Asano, S.I., & Koike, M. (2016). Potential of entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* as plant growth promoting rhizobacteria and biological control agents for tomato *Fusarium* Wilt. *International Journal of Environmental & Agriculture Research*, 2(6), 55–63. Retrieved from <https://ijear.com/Paper-June-2016/IJOEAR-JUN-2016-4.pdf>
- Qian, Y., Shi, J., Chen, Y., Lou, L., Cui, X., Cao, R., ...Tang, J. (2010). Characterization of phosphate solubilizing bacteria in sediments from a shallow eutrophic lake and a wetland: Isolation, molecular identification and phosphorus release ability determination. *Molecules*, 15(11), 8518–8533. doi: 10.3390/molecules15118518
- Saavedra, T. M., Figueroa, G. A., & Cauhi, J. G. D. (2017). Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciencia Rural*, 47(3), e20160526. doi: 10.1590/0103-8478cr20160526
- Saragih, T. H., Fajri, D. M. N., Mahmudy, W. F., Abadi, A. L., & Anggodo, Y. P. (2018). *Jatropha curcas* disease identification with extreme learning machine. *Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science*, 12(2), 883–888. doi: 10.11591/ijeecs.v12.i2.pp883-888
- Sauka, D. H., Cozzi, J. G., & Benintende, G. B. (2005). Screening of *cry2* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 88(2), 163–165. doi: 10.1007/s10482-005-3368-2
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Systat Software, Inc. (2007). SigmaPlot version 10.0. San Jose California, USA: Author. Retrieved from <https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/sigmaplot-product-updates/>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Uzair, B., Kausar, R., Bano, S. A., Fatima, S., Badshah, M., Habiba, U., & Fasim, F. (2018). Isolation and molecular characterization of a model antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* divulging *in vitro* plant growth promoting characteristics. *BioMed Research International*, Article ID 6147380. doi: 10.1155/2018/6147380
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- Wong-Villarreal, A., Yañez-Ocampo, G., Hernández-Núñez, E., Corzo-González, H., Giacomán-Vallejos, G., González-Sánchez, A., ...Espinosa-Zaragoza, S. (2019). Bacteria from *Jatropha curcas* rhizosphere, degrades aromatic hydrocarbons and promotes growth in *Zea mays*. *Open Agriculture*, 4(1), 641–649. doi: 10.1515/opag-2019-0066
- Yang, L. N., He, M. H., Ouyang, H. B., Zhu, W., Pan, Z. C., Sui, Q. J., ... Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. *BMC Microbiology*, 19(1), 205. doi: 10.1186/s12866-019-1574-8