

Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*

Aislamiento, identificación y caracterización de rizobacterias antagónicas a *Sclerotium cepivorum*

Martha Delia Ocegueda-Reyes, Josefina Casas-Solís*, Gil Virgen-Calleros, Diego Raymundo González-Eguiarte, Eduardo López-Alcocer, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. CP.44600. Camino Ramón Padilla No. 2100. Nextipac, CP. 44600. Zapopan, Jalisco; Victor Olalde-Portugal, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Unidad Irapuato. Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, CP. 36820. Irapuato Guanajuato, México. *Autor para correspondencia: jcasasmicro@gmail.com

Recibido: 04 de Noviembre, 2019.

Aceptado: 14 de Diciembre, 2019.

Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solís J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR, López-Alcocer E and Olalde-Portugal V. 2020. Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*. Mexican Journal of Phytopathology 38(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1911-2

Primera publicación DOI: 22 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 22, 2019.

Resumen. La pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* ocasiona grandes pérdidas económicas en el género *Allium* a nivel nacional. En este trabajo se aislaron, identificaron y caracterizaron tres rizobacterias con efecto antagonico sobre este hongo. Se aislaron 656 bacterias en muestras de suelo de la rizosfera de plantas de cebolla (*Allium cepa*). Y se evaluó el antagonismo *in vitro* a *S. cepivorum*. 23 de estos aislados mostraron actividad antagonica con halos de inhibición

Abstract. White rot caused by the fungus *Sclerotium cepivorum* causes great economic losses in the genus *Allium* nationwide. In this work, three rhizobacteria with antagonistic effect on this fungus were isolated, identified and characterized. 656 bacteria were isolated in soil samples from the rhizosphere of onion plants (*Allium cepa*). And *in vitro* antagonism to *S. cepivorum* was also evaluated. 23 of these isolates showed antagonistic activity with inhibition halos greater than 5 mm; three of these were greater than 20 mm; these were selected and identified as Gram positive bacilli, belonging to the genus *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis*. These rhizobacteria showed enzymatic activity of 1-aminocyclopropane 1-carboxylate deaminase, production of indolacetic acid and siderophores, as well as NaCl tolerance (up to 7.5%). Temperatures of 24 and 37 °C and humidity (50, 75 and 100%) did not affect bacterial development. Of the cell-free extracts obtained in different growth phases, the highest antifungal activity on *S. cepivorum*

superiores a 5 mm; tres de estos fueron mayores a 20 mm, los cuales se seleccionaron, y se identificaron como bacilos Gram positivos, pertenecientes al género *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*. Estas rizobacterias presentaron actividad enzimática de 1-aminociclopropano 1-carboxilato desaminasa, producción de ácido indolacético y sideróforos, tolerancia a NaCl (hasta 7.5%). Las temperaturas de 24 y 37 °C y humedad (50, 75 y 100%) no afectaron el desarrollo bacteriano. De los extractos libres de células obtenidos en diferentes fases de crecimiento, la mayor actividad antifúngica sobre *S. cepivorum* se obtuvo con los extractos de la fase estacionaria (16 a 24 h de incubación). Por los atributos de estas rizobacterias podrían ser consideradas como una alternativa para el control de *S. cepivorum* en cebolla.

Palabras clave: Pudrición blanca, *Bacillus*, sideróforos, ácido indolacético, ACC, sobrevivencia.

Sclerotium cepivorum, es un hongo que causa la enfermedad conocida como pudrición blanca en el género *Allium* (cebolla, ajo, puerro) (Castillo *et al.*, 2016). Esta enfermedad afecta a la planta, en cualquier etapa de desarrollo y su infección se incrementa a medida que crece el sistema radical y el bulbo, presenta esclerocios, que son estructuras de resistencia estimulados por compuestos de azufre presentes en los exudados radicales de la planta como aquir cisteína y sulfóxidos; que son persistentes y de fácil diseminación (Elshahawy *et al.*, 2017). En México la enfermedad se encontró por primera vez en Zacatecas en 1990 (Reveles-Hernández *et al.*, 2014). *Sclerotium cepivorum* ocasiona baja calidad y rendimiento y por ende grandes pérdidas económicas. Se han utilizado diversos productos químicos como tebuconazol, mancozeb y captan para erradicar a este patógeno (Hussain *et*

was obtained with the stationary phase extracts (16 to 24 h of incubation). Due to the attributes of these rhizobacteria they could be considered as an alternative for the control of *S. cepivorum* in onion.

Keywords: White rot, *Bacillus*, siderophores, indolacetic acid, ACC, survival.

Sclerotium cepivorum is a fungus that causes the disease known as white rot in the genus *Allium* (onion, garlic, leek) (Castillo *et al.*, 2016). This disease affects plants in any stage of development and its infection increases as the root system and the bulb grow; it presents sclerotia, which are structures of resistance, stimulated by sulfur compounds in the root exudates of the plant, such as aquir cysteine and sulfoxides, which are persistent and easily disseminated (Elshahawy *et al.*, 2017). In Mexico, the disease was found for the first time in Zacatecas in 1990 (Reveles-Hernández *et al.*, 2014). *Sclerotium cepivorum* causes low quality and yield, and therefore large economic losses. Several chemical products have been used to eradicate this pathogen, including tebuconazole, mancozeb and captan (Hussain *et al.*, 2017). However, due to epidemiological characteristics of the pathogen, after the sclerotia establish themselves in the soil, they can remain there for up to 40 years (Reveles-Hernández *et al.*, 2014). In addition, the inadequate use of fungicides has had a negative impact on the environment and its application is expensive their use is costly. As an alternative for the reduction of these products and to lessen the impact on the environment, native fungi and bacteria have been used to suppress white rot, thanks to their biocontrolling capacity (Vega-Celedón *et al.*, 2016; Kumbhar *et al.*, 2018) and biofertilizers with rhizobacteria (Moreno *et al.*, 2018).

al., 2017). Sin embargo, por características epidemiológicas del patógeno, los esclerocios una vez establecidos en el suelo pueden permanecer hasta 40 años (Reveles-Hernández *et al.*, 2014), además, el inadecuado uso de los fungicidas ha ocasionado un impacto negativo sobre el medio ambiente y su aplicación resulta costosa. Una alternativa para reducir el uso de estos productos y aminorar el impacto ecológico, se han utilizado hongos y bacterias nativas para suprimir la pudrición blanca, por la capacidad biocontroladora (Vega-Celedón *et al.*, 2016; Kumbhar *et al.*, 2018) y de biofertilizantes con rizobacterias (Moreno *et al.*, 2018).

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) que se encuentran en la rizosfera promueven el crecimiento y reducen la incidencia de las enfermedades (Glick, 2012; Hussain *et al.*, 2017). Dichas rizobacterias se clasifican de acuerdo a sus mecanismos de acción; unos actúan en el desarrollo de la planta para incrementar la disponibilidad de nutrientes por medio de la producción de ácido indolacético (AIA), actividad de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC desaminasa) que regulan los niveles de etileno, mediante la transformación de ACC en α -cetobutirato y amonio, fitohormonas sintetizadoras de auxinas, entre otros (Glick, 2012; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Otros intervienen en la disminución del efecto nocivo de fitopatógenos a través de la producción de sustancias antagonicas (tetrasulfuros, tioles, tiofenos y dióxido de azufre) y sideróforos que secuestran el hierro presente en el medio y consecuentemente estará limitado para el patógeno (Glick, 2012), este parámetro ha tomado gran interés, debido al potencial que tienen para ser utilizados en el control biológico de fitopatógenos de hongos y bacterias (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Así mismo, las RPCV son tolerantes a condiciones de salinidad y evitan el estrés causado por factores bióticos y abióticos (Datta *et al.*, 2011;

The plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) found in the rhizosphere promote growth and reduce the incidence of diseases (Glick, 2012; Hussain *et al.*, 2017). These rhizobacteria are classified according to their mechanisms of action; some act on the development of the plant to increase the availability of nutrients with the production of indolacetic acid (IAA), the activity of the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase (ACC deaminase) that regulates the ethylene levels by transforming ACC into α -ketobutyrate and ammonium, auxin-synthesizing phytohormones, among others (Glick, 2012; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Others intervene in the reduction of the harmful effect of phytopathogens through the production of antagonistic substances (tetrasulfides, tiols, tiophenes and sulfur dioxide) and siderophores, that sequester the iron present in the medium, which will therefore be limited for the pathogen (Glick, 2012). This parameter has taken great interest, due to its potential use in the biological control of fungal and bacterial phytopathogens (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Likewise, PGPR's are tolerant to salinity conditions and they avoid the stress caused by biotic and abiotic factors (Datta *et al.*, 2011; Esquivel-Cote *et al.*, 2013). thus, the aim of the present study was to evaluate *in vitro* the potential of rhizobacteria against *Sclerotium cepivorum*, responsible for white rot in onion.

Six soil samples were collected from the rhizosphere of onion plants in the farm located in Santa Anita, municipality of Tlaquepaque, Jalisco, Mexico. In order to obtain rhizobacterial isolations, we took 10 g of soil adhered to the plant root, diluted them in 90 mL of sterile distilled water, then carried out serial dilutions (10^{-7}) and inoculated 1 mL (three final dilutions) in Petri dishes with agar nutritive (AN), and incubate at 37 °C for 24 h. The PGPR strains were selected and

Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el potencial *in vitro* de rizobacterias contra *Sclerotium cepivorum* causante de la pudrición blanca en cebolla.

Se colectaron seis muestras de suelo de la rizosfera de plantas de cebolla del predio ubicado en Santa Anita, municipio de Tlaquepaque, Jalisco, México. Para obtener aislamientos de rizobacterias se tomaron 10 g de suelo adherido a las raíces de la planta, se diluyeron en 90 mL de agua destilada, se realizaron diluciones seriadas (10^{-7}) y se inoculó 1 mL (tres últimas diluciones) en cajas Petri con agar nutritivo (AN) y se incubaron a 37 °C por 24 h. Las cepas de RPCV se seleccionaron y purificaron de acuerdo a su morfología típica de las colonias y se conservaron para evaluar su efecto antagónico. Asimismo, el aislamiento de *S. cepivorum*, se realizó de acuerdo con Vimard *et al.* (1986), a partir de esclerocios de cebollas afectadas por pudrición blanca, se inocularon en medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) y se incubaron a 20 °C. Se observó el desarrollo de micelio y esclerocios diariamente por 12 días (d) (Ortega-Aguilar *et al.*, 2011; Rivera-Méndez *et al.*, 2016).

Posteriormente se realizó el antagonismo de rizobacterias sobre *S. cepivorum*. El hongo se cultivó en ADS y se extrajo un disco de micelio de 5 mm de diámetro que se colocó en el centro de la caja Petri del mismo medio y se incubaron a 20 °C por 3 d. A continuación, se inocularon cuatro repeticiones en cada caja mediante una estría de la misma rizobacteria alrededor del disco micelial perteneciente al patógeno y se incubaron a 20 °C. El testigo fue la inoculación del hongo en ausencia de rizobacterias y el experimento se concluyó cuando el hongo testigo cubrió el total de la caja Petri (Sarti y Miyazaki, 2013). La prueba se realizó por duplicado; se midieron los halos de inhibición de las rizobacterias en *S. cepivorum*, adicionalmente se calculó el porcentaje de inhibición considerando el testigo como el crecimiento radial del hongo al 100 %.

purified according to their morphology, typical of cultures, and preserved to avoid their antagonistic effect. In turn, the isolation of *S. cepivorum* was carried out following Vimard *et al.* (1986), from onion sclerotia affected by white rot inoculated in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and incubated at 20 °C. The development of mycelium and sclerotia was observed every day for 12 days (d) (Ortega-Aguilar *et al.*, 2011; Rivera-Méndez *et al.*, 2016).

The antagonism of rhizobacteria was carried out on *S. cepivorum*. The fungus was inoculated in SDA broth and a mycelium disc, 5 mm in diameter was extracted and placed in the center of the Petri dish with the same medium, and incubated at 20 °C for 3 d. Next, four repetitions were inoculated in each dish with a streak of the same rhizobacteria around the mycelial disc belonging to the pathogen and incubated at 20 °C. The control was the fungal inoculation in the absence of rhizobacteria; the experiment was concluded when the control fungus totally covered the Petri dish (Sarti and Miyazaki, 2013). The test was performed in duplicates; the inhibition zone of the rhizobacteria were measured in *S. cepivorum* and the percentage of inhibition was calculated considering the control as the radial growth of the fungus at 100%.

Moreover, the rhizobacteria with the greatest inhibition on fungus growth were characterized based on their plant growth promoting properties. This consisted of identification based on the colonial and tintorial morphology, and the metabolism by using the VITEK 2 system card (bioMérieux^{MR}), following manufacturer specifications. The functions of PGPR were characterized by evaluating the presence of the activity of the ACC deaminase, siderophores, tolerance to NaCl and the production of IAA. The enzyme activity was determined by inoculating the bacteria in a minimum salt medium (MM) supplemented with 0.3 g L⁻¹ of ACC, and incubating at 37 °C for 24 h (Luna *et al.*, 2013). In an AN we also determined the tolerance to

Por otro lado, de las rizobacterias que presentaron mayor inhibición sobre el hongo, se procedió a caracterizarlas en función de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal. Lo cual consistió en la identificación mediante la morfología colonial, tintorial y metabolismo (con la tarjeta del sistema VITEX 2 (bioMérieux^{MR}), siguiendo las especificaciones del proveedor). Se caracterizaron las funciones de RPCV, con la evaluación de la presencia de la actividad del ACC desaminasa, sideróforos, tolerancia a NaCl y producción de AIA. La actividad enzimática se determinó inoculando las bacterias en un medio mínimo de sales (MM), suplementado con 0.3 g L⁻¹ de ACC, se incubaron a 37 °C por 24 h (Luna *et al.*, 2013), en AN se determinó la tolerancia a salinidad a diferentes concentraciones de NaCl (1.5 hasta 12%). La actividad ACC desaminasa, y tolerancia a NaCl (Sánchez *et al.*, 2016), se registró como positiva en aquellas bacterias que crecieron en estos medios.

Para determinar la producción de AIA se realizó mediante una reacción colorimétrica utilizando el reactivo de Salkowski (Glickmann y Dessaux, 1995). Las pruebas se realizaron por triplicado de cada uno de los aislados seleccionados; los datos se correlacionaron con una curva estándar de AIA (de 0 a 30 ppm) y se cuantificó la concentración de AIA de las muestras. Para la producción de sideróforos por las RPCV se determinó utilizando el medio cromo azurol S (CAS) de acuerdo a la metodología de Schwyn y Neilands (Louden *et al.*, 2011). Así mismo, se procedió a realizar la prueba de sensibilidad a antibióticos, por medio del método de Kirby Bauer (Bernal y Gúzman, 1984). Se prepararon suspensiones bacterianas a una concentración de 1.5×10^7 UFC mL⁻¹ y se inocularon en cajas Petri con agar Mueller Hinton; posteriormente se colocó un multidisco[®] (Bio-Rad) con doce antimicrobianos y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se registró el diámetro de la zona de inhibición y se determinaron

salinity at different concentrations of NaCl (1.5 to 12%). The ACC desaminase activity and tolerance to NaCl (Sánchez *et al.*, 2016) were recorded as positive in the bacteria that grew in this medium.

IAA production was determined with a colorimetric reaction using Salkowski's reactive (Glickmann and Dessaux, 1995). The tests were carried out in triplicate on each of the selected isolates; the data were correlated with a standard IAA curve (0 to 30 ppm) and the concentration of IAA of the samples was quantified. The production of siderophores by the PGPR was determined using the chrome azurol S (CAS) medium, according to Schwyn and Neilands (Louden *et al.*, 2011). Likewise, the survey of sensitivity to antibiotics was carried out using the method by Kirby Bauer (Bernal and Gúzman, 1984). Bacterial suspensions were prepared at a concentration of 1.5×10^7 colony forming units (CFU) mL⁻¹ and inoculated in Petri dishes with Mueller Hinton agar. Next, a multidisc[®] (Bio-Rad) was placed with twelve antimicrobials and incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of the inhibition area was measured and the resistance and sensitivity profiles to the antibiotics were determined.

Furthermore, the bacterial kinetics was carried out for each selected isolate under axenic conditions: 1 mL of pre-inoculum of the bacteria was inoculated at a concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹ in 50 mL of potato infusion, considered as the starting time (time 0). They were then incubated at 30 °C for a period of 32 h, during which, every 2 h, the absorbance was determined at 595 nm in a spectrophotometer (Jenway model 7305). Two aliquots were taken in each sampling time, one was used to determine the bacterial growth rate (CFU), placing 1 mL of the inoculant in AN dishes, which were incubated at 30 °C and the CFU were quantified every 4 h; the other aliquot was used to obtain Cell Free Extracts (CFE). To obtain the

los perfiles de resistencia y sensibilidad a los mismos.

Por otro lado, se realizó la cinética bacteriana de cada aislado seleccionado en condiciones axénicas, para este propósito se inoculó 1 mL de pre-inóculo de la bacteria a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ en 50 mL de infusión de papa considerado como tiempo inicial (tiempo 0). Posteriormente se incubaron a 30 °C por un periodo de 32 h, durante este tiempo cada 2 h se determinó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (modelo 7305 Jenway). Adicionalmente, en cada tiempo se tomaron dos alícuotas; una se utilizó para determinar la tasa de crecimiento bacteriano (UFC), colocando 1 mL del inóculo en cajas AN, se incubaron a 30 °C y se cuantificaron UFC cada 4 h, la otra alícuota se usó para la obtención de Extractos Libres de Células (ELC). Para la obtención de los ELC se centrifugaron a 11,000 rpm por 10 min se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm. El efecto antagonico de los extractos se evaluó por el método de excavación en cajas Petri con medio ADS de acuerdo con Mitidieri (1998) mencionado por Ariza y Sánchez (2012). Esta prueba se realizó por triplicado de cada uno de los aislados en un tiempo específico obtenido y un testigo (pozos con PDA en ausencia de ELC). Por último, se determinó la sobrevivencia de las rizobacterias a diferentes porcentajes de humedad y temperaturas. Se formaron tres tratamientos con diferentes porcentajes de humedad (50, 75 y 100%) en 10 g de suelo previamente esterilizado por autoclave por triplicado, cada tratamiento se inoculó con las cepas *Bacillus* y se sometieron por separado a dos temperaturas, a 24 y 37 °C para ver el efecto de sobrevivencia de las rizobacterias a las dos temperaturas y se incubaron por 15 d (Arribalzaga, 2007).

Se aislaron 656 rizobacterias y el hongo *Sclerotium cepivorum* de plantas de cebolla. El hongo se aisló e identificó mediante sus caracteres

CFE the samples were centrifuged at 11,000 rpm for 10 min and filtered through a 0.22 µm nitrocellulose membrane. The antagonistic effect of the extracts were evaluated using the method of excavation in Petri dishes with a SDA medium, according to Mitidieri (1998) as mentioned by Ariza and Sánchez (2012). This test was performed in triplicates in each one of the isolations in a specific obtained time and a control (only with PDA in the absence of CFE). Finally, we determined the survival of the rhizobacteria at different percentages of humidity and at different temperatures. Three treatments were formed with different percentages of humidity (50, 75 and 100%) in 10 g of soil, previously sterilized (autoclaved) and in triplicate; each treatment was inoculated using the *Bacillus* strains and placed at two different temperatures, 24 and 37 °C, to observe the survival of rhizobacteria to both temperatures and then incubated for 15 d (Arribalzaga, 2007).

The fungus *Sclerotium cepivorum* and 656 rhizobacteria were isolated from onion plants. The fungus was isolated and identified by its morphological traits described in the taxonomic codes of Sarmiento and Velandía (2013). Out of the isolated bacterial diversity, only 23 isolations presented antagonistic activity and only three of these were larger than 20 mm and the percentages of inhibition of the rhizobacteria against *S. cepivorum* were between 21 and 24% (Table 1). The three selected isolates were confirmed as spore-forming bacilli using the VITEX 2 system with the reactive card. The biochemical tests were confirmed to be two *Bacillus subtilis* strains (1 and 2), and the third one was confirmed to be *B. amyloliquefaciens*, with a reliability of 95%. These characteristics have been reported by other authors for the genus *Bacillus* (Calvo and Zuniga, 2010).

The antagonistic effect of the *Bacillus* isolations on *S. cepivorum* may be due to the

morfológicos descritos en las claves taxonómicas de Sarmiento y Velandía (2013). De la diversidad bacteriana aislada, solo 23 aislados mostraron actividad antagónica y solo tres de estos fueron mayores a 20 mm y los porcentajes de inhibición de las rizobacterias contra *S. cepivorum* fueron entre 21 y 24% (Cuadro 1). De los tres aislados seleccionados, se confirmaron como bacilos positivos formadores de esporas, mediante el sistema VITEK 2 con la tarjeta reactiva, las pruebas bioquímicas confirmaron ser dos cepas *Bacillus subtilis* (1 y 2) y la tercera como *B. amyloliquefaciens*, con una confiabilidad del 95%. Estas características han sido reportadas por otros autores para el género *Bacillus* (Calvo y Zuniga, 2010).

El efecto antagónico de los aislados de *Bacillus* sobre *S. cepivorum*, puede deberse a la posible producción de moléculas antimicrobianas como lipopéptidos que han sido reportadas en rizobacterias (Sarti y Miyazaki, 2013; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). El Comité de Acción de Fungicidas Resistentes (FRAC por sus siglas en inglés), en el año 2018 enlistó a *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* como productoras de sustancias antifúngicas clasificadas en el grupo F, estas actúan en el transporte o síntesis de lípidos afectando la función e

possible production of antimicrobial molecules such as lipopeptides that have been reported in rhizobacteria (Sarti and Miyazaki, 2013; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). In 2018, the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), listed *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* as producers of antifungal substances classified in group F. They act in the transportation or synthesis of lipids, affecting the function and integrity of the cell membranes of pathogens (FRAC, 2018). On the other hand, Sánchez *et al.* (2016) reported that they are capable of producing iturines and phengicin that cause osmotic imbalances in spores and antifungal activity against filamentous fungi, along with surfactin, which inhibit the spore germination, excretion of antimicrobial enzymes such as β -glucosidases and proteases of fungi that cause leaf and root diseases (Da Silva *et al.*, 2018). Some authors have proven the biocontrolling potential of *B. subtilis* in the control of the genus *Fusarium* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (Paredes-Escalante *et al.*, 2009), and other. In the case of *B. amyloliquefaciens*, it has antimicrobial capacity and it induces a defensive response in plants (Soto *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Propiedades bioquímicas y fisiológicas bacterianas relacionadas con la promoción de crecimiento de RPCV de tres aislados de cebolla.

Table 1. Biochemical and physiological bacterial properties related with the growth promotion of PGPR of three onion isolates.

Características	<i>B. subtilis</i> -1	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i> -2
Antagonismo (Halos de inhibición en mm) ^x	21 $\pm$ 0.5 ^b	23 $\pm$ 0.2 ^a	20 $\pm$ 0.6 ^b
Porcentaje de inhibición a <i>S. cepivorum</i> (%) ^x	22.2 $\pm$ 0.5 ^b	24.2 $\pm$ 0.2 ^a	21.3 $\pm$ 0.6 ^b
Actividad de ACC desaminasa ^y	Positiva	Positiva	Positiva
Tolerancia a NaCl (1.5 a 7.5%) ^y	Positiva	Positiva	Positiva
Producción de Sideróforos (mm) ^z	18 $\pm$ 0.2 ^a	15 $\pm$ 0.1 ^b	10 $\pm$ 0.1 ^c

^x Valores de antagonismos en promedio de ocho repeticiones $\pm$ desviación estándar, ^y Positiva = actividad o crecimiento, ^z Valores de producción de sideróforos en promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes dentro de cada hilera representan diferencia estadística (ANDEVA de una vía, $p \leq 0.05$) / ^x Values of antagonisms in an average of eight repetitions $\pm$ standard deviation, ^y Positive = activity or growth, ^z Values of production of siderophores in an average of three repetitions $\pm$ standard deviation. Different letters in each row represent statistical differences (one way ANOVA, $p \leq 0.05$).

integridad de la membrana celular de los patógenos (FRAC, 2018). Por otra parte, Sánchez *et al.* (2016), reportaron que son capaces de producir iturinas y fengicinas que causan desequilibrios osmótico en las esporas y actividad antifúngica contra hongos filamentosos, además de surfactina que inhiben la germinación de las esporas, excreción de enzimas antimicrobianas como β -glucosidasas y proteasas de hongos causantes de enfermedades foliares y de raíces (Da Silva *et al.*, 2018). Algunos autores han demostrado el potencial biocontrolador de *B. subtilis*, en el control del géneros *Fusarium* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* (Paredes-Escalante *et al.*, 2009), entre otros. En el caso de *B. amyloliquefaciens* tiene capacidad antimicrobiana e induce a una respuesta de defensa en plantas (Soto *et al.*, 2018).

Los tres aislados presentaron actividad de ACC desaminasa que favorece el crecimiento de las plantas por su capacidad de convertir ACC en α -cetobutirato y amonio (Glick, 2014), además de actuar contra patógenos (Latif *et al.*, 2016) y tolerar niveles de estrés bióticos y abióticos (Vurukonda *et al.*, 2016), tolerando concentraciones de NaCl hasta de 7.5% (1280 mM) (Cuadro 1). Esto indica su adaptación al estrés causado por salinidad (Mahmood *et al.*, 2014), además que estas cepas de *Bacillus* favorece la eficiencia del uso del agua (Esquivel-Cote *et al.*, 2013) ya que pueden influir en la reducción de estrés y regulación la biosíntesis del etileno (Glick, 2014) mediante la escisión enzimática del ACC (Jayakumar *et al.*, 2018).

Para el caso de la producción de AIA, el *Bacillus subtilis*-1 fue significativamente mayor (Figura 1). Luna *et al.*, 2013 reportaron producción de indoles entre 2.3 a 6.8 mg L⁻¹ en cuatro cepas de *Bacillus*, esta variación depende del tipo de hospedante y Kumar *et al.* (2015) mencionan que el género *Bacillus* spp. es productor de AIA

The three isolations presented ACC deaminase activity that favors plant growth due to its ability to transform ACC into α -ketobutirate and ammonium (Glick, 2014), as well as to act against pathogens (Latif *et al.*, 2016) and tolerate levels of biotic and abiotic stress (Vurukonda *et al.*, 2016), tolerating concentrations of NaCl of up to 7.5% (1280 mM) (Table 1). This indicates its adaptation to stress caused by salinity (Mahmood *et al.*, 2014); in addition, these *Bacillus* strains favor water use efficiency (Esquivel-Cote *et al.*, 2013), since they can exert an influence on stress reduction and on the regulation of ethylene biosynthesis (Glick, 2014) with the enzymatic division of the ACC (Jayakumar *et al.*, 2018).

For IAA production, *Bacillus subtilis*-1 was significantly higher (Figure 1). Luna *et al.*, 2013 reported a production of indoles between 2.3 and 6.8 mg L⁻¹ in four strains of *Bacillus*. This variation depends on the type of host and Kumar *et al.* (2015) mention that the genus *Bacillus* spp. Is a producer of IAA and siderophores. The three *Bacillus* isolates produced siderophores (Table 1),

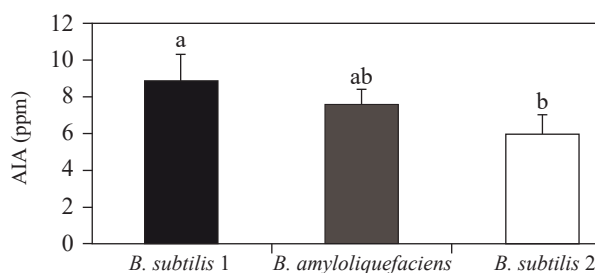


Figura 1. Producción de AIA (ppm) con adición de triptófano por parte de aislados de *Bacillus*. Valores en promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes representan diferencia estadística (ANDEVA de una vía $p \leq 0.05$).

Figure 1. Production of IAA (ppm) with the addition of tryptophan by *Bacillus* isolates. Values in the average of three repetitions $\pm$ standard deviation. Different letters represent statistical differences (one way ANOVA $p \leq 0.05$).

y sideróforos. Los tres aislados de *Bacillus* produjeron sideróforos (Cuadro 1), la producción de estos, se ha documentado ampliamente en *Bacillus subtilis* y *B. amyloliquefaciens* (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). Estos metabolitos forman un complejo de hierro donde receptores proteicos reconocen específicamente a cada especie bacteriana; esto disminuye la disponibilidad del mineral en el suelo y se establecen una competencia por el hierro lo que es letal para bacterias patógenas (Glick, 2012), esto se asocia a un mecanismo de defensa de la planta contra fitopatógenos (Ahemad y Kibret, 2013), como fue demostrado en las cepas evaluadas contra *S. cepivorum* en el estudio. Los sideróforos antimicrobianos se sintetizan por lipopéptidos de los grupos de surfactina, fengicina e iturina, a través de la enzima péptido sintetasa no ribosomal. La unión de estos lipopéptidos a la membrana provoca despolarización, translocación y ataque a los componentes intracelulares; induciendo resistencia contra el patógeno (Jayakumar *et al.*, 2018). Estas rizobacterias, aumentan el hierro disponible en el hábitat natural (Tejera-Hernández *et al.*, 2011) y permite la absorción de este mineral por la planta para constituir un mecanismo de promoción de crecimiento (Gouda *et al.*, 2018).

Con respecto a la prueba de sensibilidad, los tres aislados del género *Bacillus* mostraron un perfil de sensibilidad a 30 µg de los antibióticos de cefalotina, amikacina, clorafenicol, ceftriaxona, y resistentes a penicilina (10 U). Esta prueba de sensibilidad representa la actividad metabólica de cada una de las bacterias afectada por diferentes factores, que influyen en la promoción de crecimiento y actividad antifúngica. Esta capacidad de transferir el material genético de la bacteria, propicia mecanismos adicionales de resistencia natural contra ciertas enfermedades (Gutiérrez *et al.*, 2017); actualmente se aplican antibioticos en la producción de cultivos que pueden repercutir negativamente en

and this production has been widely documented in *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018). These metabolites form an iron complex in which protein receptors specifically recognize each bacterial species; this reduces the availability of the mineral in the soil and a competition takes place for iron, which is lethal for pathogenic bacteria (Glick, 2012), which relates to a defense mechanism in the plants against phytopathogens (Ahemad and Kibret, 2013), as shown in strains evaluated against *S. cepivorum* in the study. The antimicrobial siderophores are synthesized by lipopeptide of the groups of surfactin, phengicin and iturine, through the non-ribosomal synthetase peptide enzyme. The attachment of these lipopeptide to the membrane causes depolarization, translocation and attacks on the intracellular components, inducing resistance against the pathogen (Jayakumar *et al.*, 2018). These rhizobacteria increase the iron available in the natural habitat (Tejera-Hernández *et al.*, 2011) and helps the plant absorb this mineral to constitute a growth-enhancing mechanism (Gouda *et al.*, 2018).

Regarding the sensitivity test, the three isolations of the genus *Bacillus* displayed a sensitivity profile to 30 µg of the antibiotics cephalothin, amikacin, chloramphenicol, ceftriaxone, and resistant to penicillin (10 U). This sensitivity test represents the metabolic activity of each of the bacteria affected by different factors that exert an influence on the promotion of growth and antifungal activity. This ability to transfer the genetic material of the bacterium leads to additional natural resistance mechanisms against certain diseases (Gutiérrez *et al.*, 2017). Antibiotics are currently being applied to the production of crops that may have a negative repercussion on bacterial growth, formation of biofilm, production of indoles and the survival of bacteria in plants (Klein *et al.*, 2017).

el crecimiento de las bacterias, formación de biope-lículas, producción de índoles y la supervivencia de las bacterias en la planta (Klein *et al.*, 2017).

En el caso de la cinética bacteriana de cada ais-lado evaluado mostraron comportamientos simila-res en su desarrollo bacteriano; una fase de latencia constante hasta las 4 h, incrementó su desarrollo logarítmico hasta las 15 h; finalmente, la fase es-tacionaria se presentó hasta las 24 h; este compor-tamiento depende de la cepa bacteriana. Los meta-bolitos generados en la fase estacionaria mostraron un efecto inhibitorio contra el hongo, el ELC de tiempo 16 horas generó una inhibición del 25% y los extractos de 20 y 24 horas mostraron mayor efecto hasta el 35%. Esto puede estar relacionado a lo reportado en el género *Bacillus*, que como parte de su metabolismo libera productos tóxicos y for-ma metabolitos activos fúngicos como gramidici-na, que fueron efectivos *in vitro* en el control de 23 diferentes fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 2017). Algunos autores han demostrado que los ELC de *Bacillus* presentaron antagonismo sobre *Xantho-monas campestris* pv. *campestris* (Da Silva *et al.*, 2018) y *Fusarium oxysporum* (Rodríguez *et al.*, 2017). Tanto los aislados y sus ELC de las rizobac-terias en estudio, están relacionados con su efecto antagónico, de acuerdo a las características meta-bólicas evaluadas y con sus metabolitos producidos activos contra el hongo en estudio.

Finalmente, en el caso del estudio de la sobre-vencia de las rizobacterias a diferentes condicio-nes, mostraron que la temperatura de 24 °C con una humedad del 50%, *B. subtilis* presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia con 57.5% y el menor *B. amyloliquefaciens* con el 42.9% (Figura 2). Las tres rizobacterias mostraron que en la mayoría de las condiciones evaluadas no existen diferencias significativas en los índices de sobrevivencia con respecto a temperatura y humedad.

In the case of bacterial kinetics, each evaluated isolation displayed similar behaviors in their bacterial development; a phase of constant latency up to 4 h increased its logarithmic development until after 15 h, and finally, the stationary phase continued until after 24 h; this behavior depends on the bacterial strain. The metabolites generated in the stationary phase displayed an inhibiting effect on the fungus, the ELC of a time of 16 hours generated an inhibition of 25% and the 20 and 24 hour extracts displayed a greater effect of up to 35%. This may be related to reports on the genus *Bacillus*, which, as a part of its metabolism, released toxic products and forms fungal active metabolites such as gramidicin, which were effective *in vitro* in the control of 23 different phytopathogens (Rodríguez *et al.*, 2017). Some authors have shown that the ELC of *Bacillus* presented antagonism on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Da Silva *et al.*, 2018) and *Fusarium oxysporum* (Rodríguez *et al.*, 2017). Both the isolates and the CFE of the rhizobacteria in the study are related to their antagonistic effect, depending on the metabolic characteristics evaluated and the active metabolites produced against the fungus studied.

Finally, in the case of the study of the survival of the rhizobacteria under different conditions, they proved that in a temperature of 24 °C with a humidity of 50%, *B. subtilis* presented the highest percentage of survival with 57.5% and the lowest *B. amyloliquefaciens* with 42.9% (Figure 2). The three rhizobacteria showed that in most of the conditions evaluated, there are no significant differences in the survival rates with regard to temperature and humidity.

These result suggest a good adaptation of these rhizobacteria to the conditions of growth temperature *in vitro* of the fungus. Some authors mention that there is a great diversity of bacteria able to survive in different environments. Temperature

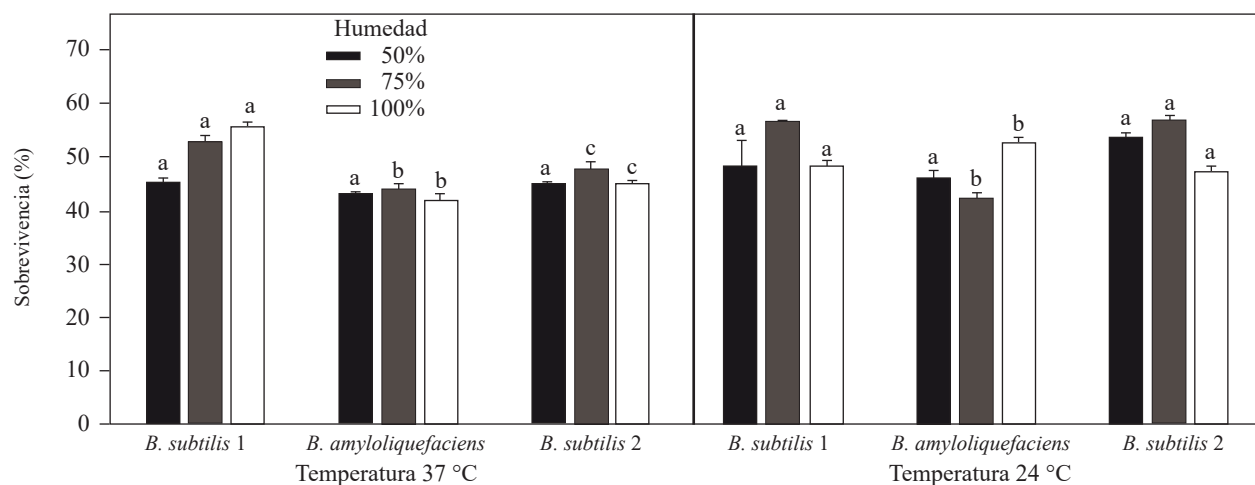


Figura 2. Sobrevivencia de rizobacterias a diferentes porcentajes de humedad (50, 75 y 100 %) y temperaturas de 24 y 37 °C. Valores en promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar. Letras diferentes en la misma condición de temperatura y humedad representan diferencia estadística (Kruskal-Wallis $p \leq 0.05$).

Figure 2. Survival of rhizobacteria to different percentages of humidity (50, 75 and 100 %) and temperatures of 24 and 37 °C. Values in the averages of three repetitions $\pm$ standard deviation. Different letters in the same conditions of temperature and humidity represent statistical differences (Kruskal-Wallis $p \leq 0.05$).

Estos resultados sugieren una buena adaptación de estas rizobacterias a las condiciones de temperatura de cultivo *in vitro* del hongo. Algunos autores mencionan que existe una gran diversidad de bacterias capaces de vivir en diversos ambientes. La temperatura puede afectar a la célula en la estructura, procesos vitales de los microorganismos, velocidad de crecimiento, composición química y la actividad enzimática (Calvo y Zúñiga, 2010); sin embargo, en las condiciones evaluadas en la presente investigación se observó un comportamiento similar en el género *Bacillus*, esto se relaciona a las características proporcionadas por las endoesporas, estructuras de resistencia, que sobreviven a ciertas condiciones de humedad y temperatura, además promueven factores de transcripción involucrados en el proceso de esporulación, lo que favoreció el proceso de adaptación y la capacidad de antagonismo microbiano (Gouda *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2018).

may affect the cell in terms of structure, vital processes of microorganisms, growth rate, chemical composition and enzymatic activity (Calvo and Zúñiga, 2010). However, under the conditions evaluated in this investigation, a similar behavior was observed in the genus *Bacillus*, and this is related to the characteristics provided by the endospores, resistance structures that survive certain conditions of humidity and temperature, and also promote transcription factors involved in the sporulation process, which favors the process of adaptation and the ability of microbial antagonism (Gouda *et al.*, 2018; Soto *et al.*, 2018).

In conclusion, the rhizobacteria of the genus *Bacillus* presented in this study and the compounds generated in the stationary phase displayed *in vitro* antifungal activity against *S. cepivorum*, along with the functional and metabolic characteristics of PGPR such as ACC activity, tolerance to NaCl (up to 7.5%), bacterial kinetics and survival. They show biologically active strains that have an effect

En conclusión las rizobacterias del genero *Bacillus* de este estudio y los compuestos generados en la fase estacionaria demostraron *in vitro* actividad antifúngica contra *S. cepivorum*, además de las características funcionales y metabólicas de RPCV como actividad ACC, tolerancia a NaCl (hasta 7.5%), cinética bacteriana y sobrevivencia. Muestran cepas biológicamente activas que tienen efecto en el control de patógenos y capacidad de producir sustancias promotoras de desarrollo vegetal. De acuerdo con lo anterior, son una alternativa sustentable para reducir el impacto por los efectos negativos al uso de agroquímicos, evitando altos costos de producción, la degradación de los suelos y la contaminación del ambiente. Así mismo, biofertilizantes en el control de *S. cepivorum* en cultivos de cebolla.

LITERATURA CITADA

- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E y Preciado-Ortiz RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista de Fitotecnia Mexicana* 35 (1):9-2. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61023295002>
- Ahemad M and Kibret M. 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26:1-20. Doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ariza Y y Sánchez L. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova* 10(18): 1794-2470. www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a01.pdf
- Arribalzaga EB. 2007. Interpretación de las curvas de supervivencia. *Revista Chilena de Cirugía* 59(1):75-83. Doi:10.4067/S0718-40262007000100013
- Calvo P y Zuñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9(1): 31-39. www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162010000100004
- Castillo H, Rojas RR y Villalta M. 2016. Actividad antagonista de *Gliocladium* sp. contra *Sclerotium cepivorum*. *Tecnología en Marcha* 57-54. Doi:10.18845 / tm.v29i7.2706
- Bernal RM y Guzman UM. 1984. Antibiógrama de discos. Normalización de la técnica de Kirby Bauer. *Biomedica* 4(3-4). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- on the pathogens control and the ability to promote plant growth-promoting substances. According to the above, they are a sustainable alternative for the reduction of the impact caused by negative effects to the use of agrochemicals, avoiding high production costs, soil degradation and environmental pollution, along with biofertilizers in the control of *S. cepivorum* in onion plantations.
- ~~~~~ End of the English version ~~~~~
- Da Silva SR, Moutinho LB, Dos Santos RD, Vasconcelos-Rodrigues IS, Talamini V, Fernandes FM and Fernandes MRP. 2018. Using antagonistic soil bacteria and their cell-free filtrates to control the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Phytopathology* 166:494-501. Doi:10.1111/jph.12709
- Datta M, Palit R, Sengupta C, Pandit MK and Banerjee S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chilli (*Capsicum annuum* L.) under field conditions. Australia. *Journal of Crop Science* 5(5):531-536. www.cropj.com/banerjee_5_5_2011_531_536.pdf
- Elshahawy IE, Saied NM, Abd-El-Kareem F and Morsy AA. 2017. Field application of Sclerotial microparasites as bio-control agents to *Stromatinia cepivora*, the cause of onion White rot. *Journal of Plant Pathology* 99(2):391-401. Doi:10.4454/jpp.v99i2.3888
- Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R y Huante P. 2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias. Una revisión. *Universidad Autónoma de México. Revista de Fitotecnia Mexicana* 36(3):251-258. www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v36n3/v36n3a10.pdf
- FRAC-Fungicide resistance action committee. 2018. Code List©. pp.1-14. www.phi-base.org/images/fracCodeList.pdf (consulta, noviembre 2018).
- Glick RB. 2012. Plant growth promoting bacteria: Mechanisms and applications. Hindawi publishing corporation, Scientifica ID-963401 p.15. Doi:10.6064/2012/963401
- Glick RB. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* 169:30-39. Doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
- Glickmann E and Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for synodic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2):793-796. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388360/pdf/hw0793.pdf
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS and Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture.

- Microbiological Research 206:131-140. Doi:10.1016/j.micres.2017.08.016
- Gutiérrez CO, Navarro ILF, Loeza LPD, Del Río ROG y Jiménez MR. 2017. Perfiles de resistencia a antibióticos y metales pesados en *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola. Nova Scientia 9(19):97-112. Doi:10.21640/ns.v9i19.957
- Hussain W, Elzaawely AA, El Sheery NI, Ismail AA and El-Zahaby HM. 2017. Biological control of onion white rot disease caused by *Sclerotium cepivorum*. Environment, Biodiversity & soil Security 1:101-107. Doi:10.21608/JENVBS.2017.1547.1008
- Jayakumar AK, Krishna A, Mohan M, Nair CI and Radhakrishnan EK. 2018. Plant growth enhancement, disease resistance, 1. and elemental modulatory effects of plant probiotic endophytic *Bacillus* sp FcL. Probiotics Antimicrob Proteins 1-9. Doi:10.1007/s12602-018-9417-8
- Klein JM, Loper JE and Stockwell VO. 2017. Influence of endogenous plasmids on phenotypes of *Pantoea vagans* Strain C9-1 associated whit epiphytic fitness. Journal of Plant Pathology 99:81-89. Doi:10.4454/jpp.v99i0.3914
- Kumar GP, Kumar De T and Kanti MT. 2015. Production and etabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legue *Neptunia oleracea* Lour. Journal of Botany 1-11. Doi:10.1155/2015/575067
- Kumbhar VR, Mane, SR, Birajdar GM, Bansode SA, Swami CS and Bhale UN. 2018. Physicochemical characterization and papulation dynamics of mycoflora in infected rhizosphere soil of onion white rot caused by *Sclerotium cepivorum*. Internationa Journal of current Microbiology and Applied Sciences 7(8):3771-3780. Doi:10.20546/ijcmas.2018.708.384
- Latif KA, Ahmed HB, Elyassi A, Ali S, Al-Hosni K, Hussain J, Al-Harrasi A and In-Jung L. 2016. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solarium lycopersicum*. Electronic Journal of Biotechnology 19(3):58-64. Doi:10.1016/j.ejbt.2016.02.001
- Louden CB, Haarman D and Lynne MA. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. Journal of Microbiology & Biology Education 12(1):51-53. Doi:10.1128/jmbe.v12i1.249
- Luna ML, Martínez PR, Hernández IM, Arvizu MSM y Pacheco AJR. 2013. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista Fitotecnia Mexicana 36(1):63-69. www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v36n1/v36n1a7.pdf
- Mahmood NS, Ahmad M, Zahir AZ, Javaid A and Ashraf M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. Biotechnology advances 32(2):429-448. Doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.005
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez M y Borges-Gómez LC. 2016. *Bacillus* spp. en el control de marchitez causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. Revista Mexicana de Fitopatología 34(3):208-222. Doi:10.18781/R.MEX.FIT.1603-1.
- Moreno RA, García MV, Reyes CJL, Vázquez AJ y Cano RP. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. Revista Colombiana de Biotecnología 20(1): 68-83. Doi:10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707
- Ortega-Aguilar BL, Alarcón A and Ferrera-Cerrato R. 2011. Effect of potassium bicarbonate on fungal growth and sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and its interaction with *Trichoderma*. Revista Mexicana de Micología 33:53-61. www.redalyc.org/articulo.oa?id=88319884007
- Paredes-Escalante JE, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Sañudo-Barajas JA y Valdez-Torres JB. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicerarietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología 27(1):27-35. www.redalyc.org/articulo.oa?id=61211414004
- Reveles-Hernández M, Velázquez-Valle R, Reveles-Torres LR y Cid-Ríos JA. 2014. Guía para la producción de cebolla en Zacatecas. Folleto Técnico No. 62. Campo experimental Zacatecas, CIRNOCINIFAP, Calera, Zac., México. 40. www.zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/prodCebolla.pdf
- Rivera-Méndez W, Zúñiga-Vega C y Brenes-Madriz J. 2016. Control biológico del hongo *Sclerotium cepivorum* utilizado *Trichoderma asperellum* en el cultivo de ajo en Costa Rica. Tecnología en Marcha 41-50. Doi:org/10.18845/tm.v29i7.2704
- Rodríguez GCA, Bultrago JE, Betancurt AD y Lara CR. 2017. Actividad antagonista de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*: un aporte a la agricultura sostenible. Revista Nova 3:9-19. http://revistas.sena.edu.co/index.php/rnova/article/view/1515/1691
- Sánchez LDB, Pérez PJV y David HHA. 2016. Efecto de la PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. Revista Colombiana de Biotecnología 18(1):65-72. Doi:10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413
- Sarmiento GA y Velandía MJ. 2013. Evaluación de hongos y bacterias aislados de gallinaza en biocontrol de *Sclerotium cepivorum* Berk. Ciencia y Agricultura 10(2):37-43. Doi:10.19053/01228420.2839
- Sarti GC y Miyazaki SS. 2013. Actividad antifúngica de Extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de Soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. Agrociencia 47(4):373-383. www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n4/v47n4a6.pdf
- Schwyn B y Neilands JB. 1987. Ensayo químico universal para la detección y determinación de sideróforos. 160(1):47-56. Doi:org/10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Soto CF, Tramón PC, Aqueveque MP, and de Bruijn J. 2018. Antagonist microorganisms that inhibit the development of post-harvest pathogens in lemons (*Citrus limon* L.). Chilean Journal of Agricultural & Animal Science 34(2):173-184. Doi:10.4067/S0719-38902018005000406
- Vega-Celedón P, Canchignia MH, González M y Seeger M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Cultivos Topicales. 37: 33-39. Doi:10.13140/RG.2.1.5158.3609
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA y Estrada-Alvarado MI. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bio-

- seguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1):95-130. Doi:10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
- Vimard B, Leggett ME and Rahe JE. 1986. Rapid isolation of Sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil by sucrose centrifugation. The American Phytopathology Society 76(4):465-467. www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1986Articles/Phyto76n04_465.PDF
- Vurukonda SS, Vardharajula S, Shrivastava M and SkZ A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research 184: 13-24. Doi:10.1016/j.micres.2015.12.003