

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y
RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE LA
RIZÓSFERA DE *Vitis vinifera***

TESIS

QUE PRESENTA

VERÓNICA ORDÓÑEZ BELTRÁN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DOCTORA EN CIENCIAS HORTOFRUTÍCOLAS**

CHIHUAHUA, CHIH., FEBRERO 2020

TÍTULO DE LA TESIS

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y
RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE LA
RIZÓSFERA DE *Vitis vinifera***

LINEA DE INVESTIGACIÓN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN HORTOFRUTÍCOLA

DISCIPLINA

BIOTECNOLOGÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, certifican que han leído y recomiendan a la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas la aceptación de la tesis de

Maestría titulada: **“CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE *Vitis vinifera*.”**


Realizada por: **VERÓNICA ORDÓÑEZ BELTRÁN**

Como cumplimiento parcial de los requerimientos para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**

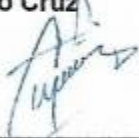
Ratifican que las firmas son verdaderas:



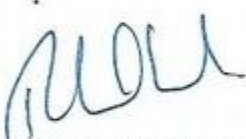
Dr. Damián Aarón Porras Flores
Director




Dra. Nuvia Orduño Cruz
Director de Tesis



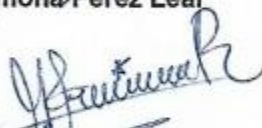
Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz
Co-Director
Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo A. C.



M. C. Ramón Saúl Luján Aguirre
Secretario de Investigación y Posgrado




Dra. Ramona Pérez Leal
Asesor



Dra. María Janeth Rodríguez Roque
Asesor

10/02/2020

Fecha



Dr. Juan Luis Jacobo Cuellar
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Those who subscribe, certify that they have read and recommend to the Department of Agrotechnological Sciences the acceptance of the thesis entitled:

"CHARACTERIZATION OF FUNGI ENTOMOPATHOGENS AND GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA OF THE RIZÓSFERA DE *Vitis vinifera*."

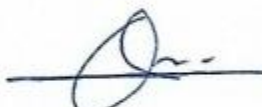
Submitted by: **VERÓNICA ORDÓÑEZ BELTRÁN**

In partial fulfillment of the requirements to obtain the degree of **DOCTOR OF SCIENCE**

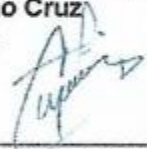
Ratify that signatures are real:




Dr. Damián Aarón Porras Flores
Director




Dra. Nuvia Orduño Cruz
Director de Tesis



Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz
Co-Director
Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo A. C.



M. C. Ramón Saúl Luján Aguirre
Secretario de Investigación y Posgrado




Dra. Ramona Pérez Leal
Asesor



Dra. María Janeth Rodríguez Roque
Asesor

10/02/2020

Fecha



Dr. Juan Luis Jacobo Cuellar
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, miembros del Cuerpo Académico **UACH-CA-11 FRUTALES DE ZONA TEMPLADA**, han fungido como parte integral en la asesoría de **Verónica Ordóñez Beltrán** durante el desarrollo y conclusión del trabajo de Investigación: **"CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO DE LA RIZÓSFERA DE *Vitis vinifera*"**.

Dra. Ramona Pérez Leal
Responsable

Dra. Nuvia Orduño Cruz
Integrante

Dra. María Janeth Rodríguez Roque
Integrante

10/02/2020

Fecha

Cd. Universitaria s/n Campus 1
Chihuahua, Chih., México C.P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo prestado durante mis estudios de posgrado.

A FACIATEC, por haberme admitido y por las materias impartidas, las cuales complementaron mi proyecto de investigación.

Al CIAD y al Laboratorio de Microbiología, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo y por las facilidades brindadas a lo largo del posgrado para la realización del trabajo de investigación.

A la Dra. Nuvia Orduño Cruz, del Laboratorio de Entomología de FACIATEC, por aceptarme como su asesora, brindarme su confianza y apoyarme en todo momento con asesorías y consejos.

Al Dr. Carlos Horacio Acosta Muñoz, del Laboratorio de Microbiología del CIAD, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo, por su apoyo, confianza, asesorías y consejos.

A mis asesores: Dr. Juan Luis Jacobo Cuellar, Dra. Ramona Perez Leal y la Dra. María Janeth Rodríguez, por haber formado parte de mi equipo para la realización de este proyecto de investigación, por darme un espacio de su tiempo para aclarar mis dudas y por los consejos brindados.

Al Dr. Claudio Ríos Velasco, del Laboratorio de Fisiología de Poscosecha, Patología Vegetal y Control Biológico del CIAD, porque a pesar de no formar parte del equipo de este proyecto, me abrió las puertas de su laboratorio, me brindó apoyo y asesorías que fueron muy valiosos para la realización de mi trabajo de investigación. De la misma manera agradezco el apoyo de su equipo de trabajo (Fernanda, Magali, Juan, Daniel) quienes me ayudaron tanto en lo experimental como resolviendo dudas.

Al maestro Alex Romo y Rita del CIAD, por su apoyo, asesorías y consejos.

A mis compañeros de laboratorio en el CIAD (Adrian, Diana, Mayra, Gerardo, Vanessa, Liz, Angy, Alex, Bony, América), por aclararme dudas, apoyarme en las cuestiones de laboratorio y hacer que este camino de posgrado fuera mas llevadero, pero sobre todo por haberme brindado su amistad.

A mis compañeros de generación, y a mis amigas Noemi y Katy por haber compartido este difícil camino conmigo.

A Dios, por siempre estar a mi lado y darme el coraje para seguir aún cuando las cosas parecían difíciles.

A mi esposo Luis por que sin su apoyo tanto personal como profesional creo que no hubiera podido culminar el posgrado y a mi hijo Emilio por ser la motivación para hacer las cosas de la mejor manera posible.

A mis padres Consuelo Beltrán Ríos y Elfido Ordóñez Chávez porque me enseñaron el valor de la responsabilidad y a no no rendirme.

A mis hermanos Fati, Geli y Elfido por haber estado ahí y recordarme que uno puede lograr todo lo que se proponga.

A mis suegros por haberme alentado y brindado fortaleza para seguir adelante, además haberme apoyado con el cuidado de mi hijo.

A todas esas personas que contribuyeron de alguna manera tanto en mi trabajo como en mi vida personal.

DEDICATORIA

A mi esposo Luis Alberto y mi hijo Luis Emilio, quienes fueron mi principal motivación para levantarme y esforzarme cada día.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
CAPÍTULO I: Revisión de literatura.....	5
Resumen	5
Abstract.....	5
Introducción	6
Hongos entomopatógenos.....	6
Mecanismos de acción de hongos entomopatógenos.....	8
Mecanismos de defensa de los insectos.....	9
Bacterias promotoras de crecimiento.....	10
Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento.....	11
Fijación de nitrógeno.....	11
Producción de Ácido indolacético.....	11
Producción de Sideróforos.....	13
Solubilización de fosfatos.....	14

Ventajas y desventajas del uso de hongos entomopatógenos y rizobacterias promotoras de crecimiento	15
Hongos entomopatógenos.....	15
<i>Metarhizium</i> spp.....	15
<i>Beauveria</i> spp.	16
Bacterias promotoras de crecimiento	18
<i>Enterobacter</i> spp.....	18
<i>Chryseobacterium</i> spp.	20
<i>Exiguobacterium</i> spp.....	21
<i>Pseudomonas</i> spp.....	23
<i>Acinetobacter</i> spp.....	24
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	25
Conclusiones y perspectivas	28
Literatura citada	28
CAPÍTULO II: Molecular identification of genera <i>Metarhizium</i> (Hypocreales: Clavicipitaceae) and <i>Beauveria</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae) and their <i>in vitro</i> development at different temperatures.....	
	55
Abstract.....	55
Introduction	56
Materials and methods.....	58
Isolation and purification.....	58
Molecular identification.....	59
Inoculum.....	60
Effect of temperature on radial growth	60
Effect of temperature on germination	60
Effect of temperature on sporulation	61

Pathogenicity of <i>B. pseudobassiana</i> and <i>M. anisopliae</i> against larvae of <i>Tenebrio molitor</i>	61
Statistical analysis	62
Results.....	62
Molecular identification.....	62
Effect of temperature on radial growth	63
Effect of temperature on germination	63
Effect of temperature on sporulation	63
Pathogenicity of <i>B. pseudobassiana</i> and <i>M. anisopliae</i> against larvae of <i>Tenebrio molitor</i>	64
Discussion	64
References	67
CAPÍTULO III: Characterization of rhizobacteria associated with <i>Vitis vinifera</i> and its interaction <i>in vitro</i> with entomopathogenic fungi.....	87
Abstract.....	88
Introduction	89
Materials and methods.....	91
Samples of soil and biological material	91
Isolation and purification.....	91
Molecular identification.....	92
Inoculum.....	93
Growth in Nitrogen Free Broth medium (Nfb).....	93
Siderophore production	94
Indolacetic Acid Production	94
Phosphorus Solubilization	95
<i>In vitro</i> antagonism of growth promoting bacteria.....	95

<i>In vitro</i> antagonism between <i>Beauveria pseudobassiana</i> and <i>Metarhizium anisopliae</i>	96
Antagonism between growth promoting rhizobacteria and entomopathogenic fungi	96
Experimental design and data analysis	97
Results.....	98
Molecular identification.....	98
Growth in Nitrogen Free Broth medium (Nfb)	98
Siderophore production	98
Indolacetic Acid Production	99
Phosphorus Solubilization	99
Antagonism among growth promoting rhizobacteria	99
Antagonism between <i>Beauveria pseudobassiana</i> and <i>Metarhizium anisopliae</i>	100
Antagonism between entomopathogenic fungi and rhizobacteria	100
Conclusion.....	108
References	109
CONCLUSION GENERAL	129

ÍNDICE DE CUADROS

Table 1. Isolates used in the study.	74
Table 2. Sites for collecting soil samples associated with the rhizosphere of <i>Vitis vinifera</i> in the state of Chihuahua, Mexico. Number of isolates of <i>Beauveria</i> and <i>Metarhizium</i> obtained in each locality.....	124
Table 3. Bacteria isolated from the rhizosphere of <i>Vitis vinifera</i> in the state of Chihuahua, Mexico.....	125
Table 4. Inhibition of radial growth among entomopathogenic fungi.....	126
Table 5. Inhibition of radial growth of entomopathogenic fungi by growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of <i>Vitis vinifera</i>	127
Table 6. Summary of the potential of PGPR.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis del ácido indol acético (indol 3-acetato; auxina) a partir de triptófano en plantas y en bacterias; tomado de García Breijo, 2006.	12
Figura 2. Estructura química de sideróforos. a) Estructura general de enterobactina férrica, un sideróforo tipo Catecol. b) Estructura general de ferricromo, un sideróforo tipo hidroxamato (Neilands, 1995).....	13
Figure 3. Entomopathogenic fungus dendrogram constructed with the sequences of the ITS 18S rDNA region, based on the Neighbor-Joining method. The access numbers of each of the isolated bacteria are shown.	76
Figure 4. Radial growth of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 15°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	77
Figure 5. Radial growth of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 25°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	78
Figure 6. Radial growth of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 35°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	79
Figure 7. Germination of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 15°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	80
Figure 8. Germination of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 25°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	81
Figure 9. Germination of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 35°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	82
Figure 10. Sporulation of six isolates of <i>M. anisopliae</i> and four isolates of <i>B. pseudobassiana</i> at the temperature of 15°C. Error bars represents 95% confidence intervals.....	83

Figure 11. Sporulation of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 25°C. Error bars represents 95% confidence intervals..... 84

Figure 12. Sporulation of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 35°C. Error bars represents 95% confidence intervals..... 85

Figure 13. Mortality among *T. molitor* larvae under the isolates *M. anisopliae* and *B. pseudobassiana*. Error bars represents 95% confidence intervals..... 86

Figure 14. Bacterial dendrogram constructed with the sequences of the ITS 16S rDNA region, based on the Neighbor-Joining method. The access numbers of each of the isolated bacteria are shown. 122

Figure 15. Characterization of PGPR, A: Growth in Nfb medium, B: Production of siderophores, C: Solubilization of Phosphorus, D: Synthesis of Indo-acetic acid. The means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test). 123

RESUMEN

Prácticas sustentables en la agricultura para la fertilización y el manejo de plagas, pueden realizarse con el empleo de microorganismos benéficos encontrados en la naturaleza. En la presente investigación se realizó la caracterización *in vitro* de hongos entomopatógenos (HE) y rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) y se evaluó la relación simbiótica entre ellos. La metodología incluyó el aislamiento, identificación molecular, efecto de las temperaturas y la patogenicidad de HE. Para el caso de las PGPR, se analizó la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, producción de sideróforos y ácido indolacético; finalmente, se determinó la asociación entre ellos. De las especies aisladas de HE (*M. anisopliae* y *B. bassiana*), *M. anisopliae* presentó una mejor adaptabilidad a distintas temperaturas (15, 25 y 35°C), no habiendo diferencias en la patogenicidad ($F=0.66$; $p>0.6861$). Los géneros aislados de PGPR fueron: *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*, los organismos que promovieron mayor crecimiento (fijación de N, producción de sideróforos y AIA y solubilización de fósforo), fueron *Chryseobacterium* y *Bacillus*. El crecimiento radial de *B. pseudobassiana* y *M. anisopliae* fue afectado negativamente por las PGPR. No obstante, el de *B. pseudobassiana* fue inhibido 2.6 veces más que el de *M. anisopliae*. La identificación de microorganismos de la rizosfera de vid y la influencia de factores bióticos y abióticos evaluados en este trabajo conducen a sugerir que existen hongos entomopatógenos y rizobacterias promotoras de crecimiento en la rizósfera de la vid que tienen efecto sinérgico entre ellos, con potencial para ser utilizados en consorcio en distintos cultivos y para el control de plagas.

ABSTRACT

Sustainable agricultural practices, such as fertilization and pest management can be achieved through the use of microorganisms found in nature. In the present investigation, the *in vitro* characterization of entomopathogenic fungi (EF) and growth promoting rhizobacteria (PGPR) was performed and the symbiotic relationship between them was evaluated. The methodology included isolation, molecular identification, effect of temperatures and the pathogenicity of EF. In the case of PGPR, nitrogen fixation, phosphorus solubilization, siderophores and indolacetic acid production was analyzed; finally, the antagonism *in vitro* between EF and PGPR was also determined. Between the isolated species of EF (*M. anisopliae* and *B. bassiana*), *M. anisopliae* had a better adaptability at different temperatures (15, 25 and 35 ° C), with no significant differences in pathogenicity among them ($F = 0.66$; $p > 0.6861$). Among the isolated PGPR genera (*Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Stenotrophomonas*), the best results were obtained by *Chryseobacterium* and *Bacillus*. The radial growth of *B. pseudobassiana* and *M. anisopliae* was negatively affected by PGPR. However, that of *B. pseudobassiana* was inhibited 2.6 times more than that of *M. anisopliae*. In conclusion, there are entomopathogenic fungi and rhizobacteria that promote growth in the rhizosphere of the grapevine, with the potential to be used in consortium in different crops and pests, and provide greater protection for plants.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La agricultura es una de las actividades humanas que más contribuye a la contaminación, con el uso excesivo de fertilizantes y pesticidas órganosintéticos, causantes de daños ambientales y riesgos potenciales a la salud humana (Vejan et al., 2016). Debido a estos efectos negativos, en los últimos años el uso de microorganismos benéficos esta ganando importancia en los sistemas de producción sostenibles (Ramesh et al., 2014).

En la rizósfera de las plantas se encuentran bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas, arqueas y artrópodos (Raaijmakers et al., 2009; Bonkowski et al., 2009; Buée et al., 2009), que interactúan con la planta y entre ellos mismos (Jambon et al., 2018). Dentro de las interacciones planta-microorganismos se encuentran rizobacterias promotoras de crecimiento y hongos entomopatógenos. Las rizobacterias promotoras de crecimiento pueden movilizar nutrientes del suelo y hacerlos disponibles para la planta, favoreciendo su crecimiento y resistencia (Ramesh et al., 2014; Kim et al., 2014), destacando los géneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Hol et al., 2014). Por otro lado, los hongos entomopatógenos han sido los más comunes y estudiados son causantes de enfermedad en insectos (Leger y Wang, 2010). El potencial de estos microorganismos para infectar insectos plaga en distintos cultivos está bien documentado (Rustiguel et al., 2017), por lo que representa una alternativa al uso de plaguicidas organosintéticos, siendo los géneros más frecuentes *Beauveria* y *Metarhizium* (Agarwal, 1990; Sandhu et al., 2001).

Aunque en la rizósfera los microorganismos interactúan entre sí (Agler et al., 2016; Jambo et al., 2018), como estrategias de control biológico y nutrición de cultivos en el manejo de agroecosistemas éstos se utilizan por separado. Senthilraja et al., (2010), mostraron que en condiciones de campo e invernadero la combinación de *Pseudomonas fluorescens* y *Beauveria bassiana* redujo poblaciones de minador de hojas (*Aproaerema modicella*) y pudrición de cuello causada por el hongo

Sclerotium rolfsii en plantas de cacahuate (*Arachis hypogaea*) en un 88% y 100%, respectivamente, además provocó aumento en el llenado y número de vainas, lo que resultó en un mayor rendimiento. En otro estudio realizado en arroz, la formulación con estas mismas especies redujo la incidencia de enrollador de hoja (*Cnaphalocrocis medinalis*) y tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani*) e incrementó la producción de este cultivo (Karthiba et al., 2010). Sin embargo, estos son de los pocos estudios donde combinan hongos entomopatógenos con bacterias promotoras de crecimiento, siendo la mezcla de éstos un área emergente de estudio.

Aunado a ello, la microbiota de la rizósfera del cultivo de *Vitis vinífera*, ha sido poco estudiada (Pinto y Gomes, 2016), por lo que la identificación de cepas con beneficio potencial para la planta representa un desafío y una tecnología para la protección de este cultivo, que tiene importancia económica global. En México el cultivo de vid es destinado al consumo en fresco, industria vinícola y fruto seco (uva pasa), siendo los principales estados productores Sonora y Zacatecas, con 91 y 6 % de la participación nacional respectivamente (SAGARPA, 2017). En el estado de Chihuahua, la uva es uno de los frutos con potencial como cultivo alternativo destinado a la industria del vino, debido a su adaptabilidad climática, rendimiento y potencial de exportación (SIFUPRO, 2013). Las principales regiones productoras destinadas a la vitivinicultura son Bachíniva, Delicias, Sacramento y Chihuahua, donde destaca la producción de variedades tintas como Cabernet sauvignon, Shiraz, Merlot, Lenoir y variedades blancas como Chardonnay, Chenin, Semillon (SAGARPA, 2014). Sin embargo, existen factores bióticos, como plagas y enfermedades, que pueden reducir la producción, calidad de la fruta y en infestaciones severas causar la muerte de de la planta. En México se han descrito diversas plagas destacando: descarnador de la hoja (*Harrisinia brillians*), trips (*Frankliniella*), pulgón (*Aphis illinoisensis*) y chicharrita (*Erythroneura* spp), barrenadores del sarmiento (*Micropate labialis* Lesne) y frailecillo (*Macroductylus* spp). Entre las enfermedades más comunes se encuentran la cenicilla polvorienta (*Oidium* spp.), brazo muerto de la vid (*Eutipa armeniaca*), pudrición texana (*Phymatotrichopsis omnívora*) y Mildiú (*Plasmopara vitícola*). De la misma manera,

se han reportado el virus del enrollamiento de la hoja (GLRaV), virus de la hoja de abanico (GFLV) y corteza corchosa-madera rugosa provocado por un complejo viral (González et al., 2014).

A pesar de la importancia económica de la vid, es de los cultivos en los que poco se ha estudiado el microbioma asociado. Con respecto a ello, Zarraonaindia y Gilbert (2014), demostraron que el microbioma puede influir en la sanidad y crecimiento del cultivo, repercutiendo en la producción y calidad del vino. Dentro de la diversidad de microorganismos asociados a la raíz de vid, se ha prestado mayor atención a bacterias y hongos endófitos (Cosoveanu et al., 2014, Yousaf et al., 2014), así como a hongos micorrízicos arbusculares (Holland et al., 2013) y en menor cantidad a hongos entomopatógenos.

De los estudios realizados con rizobacterias promotoras de crecimiento en vid, destacan los realizados por Liu et al., (2016), ellos aislaron *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus Megaterium*, *Klebsiella variicola*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Enterobacter aerogenes* de la rizósfera de vid de la variedad *Cabernet Sauvignon*. Los resultados mostraron que dos cepas de *Bacillus aryabhatai* (JY17 y JY22) fueron eficientes en la fijación de nitrógeno, producción de ácido indolacético, producción de sideróforos y las enzimas 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, quitinasa y proteasa. En pruebas en invernadero ayudaron al crecimiento de la variedad *Cabernet sauvignon*. En otro estudio, se detectó que el 61% de las rizobacterias y bacterias endófitas aisladas de diversos cultivares de vid, fueron capaces de solubilizar fosfato insoluble (Marasco et al., 2013).

Con respecto a hongos entomopatógenos, se han evaluado cepas de *Metarhizium anisopliae* para el control de palomilla europea (*Lobesia botrana*) y podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), los resultados indicaron eficiencia en el control de larvas y pupas de *L. botrana*, con tasas de mortalidad del 81 al 98% en ambos casos. Se inhibió el crecimiento de cepas de *B. cinerea* en un 47 a 64% (Sammaritano et al., 2018). Rondot y Reineke (2018), encontraron que cepas endófitas de *Beauveria bassiana* redujeron la tasa de infestación y el crecimiento de cochinilla (*Planococcus ficus*) y chicharrita (*Empoasca vitis*). Además, se ha demostrado el potencial de

estos hongos para la promoción del crecimiento vegetal. Por lo anterior, la exploración de la microbiota de la rizósfera de la vid permitirá entender el equilibrio entre los microorganismos, dilucidar sus interacciones positivas e identificar cepas con potencial benéfico para la planta que podrían aplicarse como agentes de control biológico, promotores del crecimiento vegetal o biofertilizantes (Pinto y gomez, 2016).

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar hongos entomopatógenos y bacterias promotoras de crecimiento de la rizósfera de la vid.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar hongos entomopatógenos de la rizosfera de *Vitis vinífera*.

Caracterizar rizobacterias asociadas a *Vitis vinifera* y su interacción *in vitro* con hongos entomopatógenos.

CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

Resumen

Los hongos entomopatógenos (HE) y las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) han resultado una buena alternativa al uso de plaguicidas y fertilizantes químicos sintéticos, debido a que no contaminan el suelo, no alteran el balance ecológico y son amigables con el medio ambiente. Los HE han resultado altamente efectivos en el control de plagas y enfermedades que afectan a cultivos como maíz, frijol, sorgo, soja, calabaza entre otros y las PGPR han ayudado a promover el crecimiento vegetal en trigo, chile, tomate, verdolagas, alfalfa, maíz, caña de azúcar, etc. Los HE actúan por medio de mecanismos que les permiten atravesar la cutícula y pared del tracto digestivo de los insectos; por su parte las PGPR convierten nutrientes del suelo de formas no disponibles a fácilmente asimilables por las plantas. No obstante, a pesar de los beneficios de los HE y PGPR, es importante conocer las desventajas de este tipo de estrategias biológicas; siendo una de las más importantes el impacto sobre organismos no objetivo, incluyendo los humanos.

Abstract

Entomopathogenic fungi (HE) and growth promoting rhizobacteria (PGPR) have been considered as alternative to the use of pesticides and synthetic chemical fertilizers, because they are environmental friendly, they neither pollute the soil nor alter the ecological balance. In addition, HE have been effective in controlling pests and diseases that affect crops such as corn, beans, sorghum, soybeans, squash, among others, and PGRP have promoted plant growth in wheat, chili, tomatoes, verdolagas, alfalfa, corn, sugar cane, etc. HE acts through mechanisms that allow its passage through the cuticle and wall of insect digestive tract; for their part, PGPR convert not available nutrients from the soil to easily assimilable nutrients for plants. However, despite the benefits of HE and PGPR, it is important to know the disadvantages of such biological strategies; One of the most important is the impact on non-target organisms, including humans.

Introducción

La agricultura es de las actividades humanas que contribuye a la creciente cantidad de contaminantes químicos, a través del uso excesivo de fertilizantes y pesticidas sintéticos, causando daños ambientales y riesgos a la salud humana (Vejan et al., 2016). Debido a sus efectos negativos en los ecosistemas, el uso de microorganismos benéficos ha ganado importancias en los últimos años, principalmente en sistemas de producción sostenibles (Ramesh et al., 2014). Las bacterias promotoras de crecimiento (PGPB) pueden actuar como biofertilizantes, ya que ayudan movilizando nutrientes del suelo o haciéndolos disponibles para la planta, afectando positivamente su crecimiento, inmunidad y resistencia a factores bióticos y abióticos (Ramesh et al., 2014; Kim et al., 2014). Por otro lado, el potencial de los hongos entomopatógenos (HE) para infectar insectos plaga de distintos cultivos está bien documentado (Rustiguel et al., 2017), por lo que representa una alternativa al uso de plaguicidas organosintéticos.

A pesar de los beneficios que proporcionan estos microorganismos a las plantas, también pueden presentar efectos adversos sobre organismos no blanco, incluyendo a los humanos, por lo que el objetivo de esta revisión fue actualizar con información de los últimos diez años, el modo de acción, ventajas y desventajas del uso de PGPR y HE.

Hongos entomopatógenos

Son microorganismos causantes de enfermedades en insectos en la naturaleza se han reportado aproximadamente mil especies de hongos (Leger y Wang 2010) que se encuentran distribuidos en varios hábitats, incluyendo acuático, forestal, pastizal y agrícola (Lacey et al., 1995). Una especie de hongo puede afectar a varios ordenes de insectos entre los que destacan Orthoptera, Dermaptera, Hemiptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Coleoptera (Zimmermann, 2007).

Las epizootias causadas por hongos entomopatógenos en la agricultura son muy comunes, causadas principalmente por los generos *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Sporodiniella*, *Stilbella*, *Hirsutella*, *Metarhizium* y *Erynia* (Inglis et al., 1996). De las mil especies de hongos entomopatógenos reportadas, únicamente diez son

reconocidas como agentes de control biológico (Hajek y Leger, 1994), entre los que se encuentran *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Humber, 2016).

Durante los últimos veinte años, el uso de hongos entomopatógenos ha incrementado debido a la necesidad de prácticas ecológicas y sustentables, en el manejo de sistemas agrícolas. Algunos de los atributos biológicos que se buscan en estos HE son crecimiento, germinación y producción de conidios en el menor tiempo, que comúnmente se ven reflejados en la virulencia. Desafortunadamente, la carencia de información en diversidad y ecología de HE nativos asociados a raíces de plantas ha restringido el uso de microorganismos, como agentes de control biológico (Bojórquez et al., 2010). Existen factores que influyen en las características de los HE, entre estos se encuentra la región de origen, la cual está relacionada con variabilidad intraespecífica (Rehener y Buckley, 2005) que se manifiesta en gradientes de virulencia entre razas y biotipos. Esta variación puede ser detectada mediante técnicas moleculares, lo cual mejora el conocimiento de las características de poblaciones, tipo de hábitat y la relación con su hospedero.

Por otra parte, las condiciones ambientales como la humedad, radiación solar y temperatura, afectan la propagación, dispersión y persistencia de HE (Tanada y Kaya, 1993; Rath, 2000; Inglis et al., 2001). Siendo la temperatura el factor determinante sobre el crecimiento, germinación y esporulación (Ortíz-Catón et al., 2011). Varios estudios han determinado que la temperatura óptima para el desarrollo de estas etapas se encuentra en un rango de 25-30°C, lo que favorece el inicio de la infección, periodo de incubación y viabilidad de estos microorganismos (Kiewnick, 2006; Bugeme et al., 2008; Orduño-Cruz et al., 2015). Una esporulación rápida y abundante es primordial para el establecimiento en campo y está relacionada con el número de infecciones y epizootias (Ortíz-Catón et al., 2011). La germinación, en el menor tiempo (2, 4 o 6 h) está asociada a una mayor virulencia y patogenicidad (Morgan et al., 1995; Altre et al., 1999). Por lo anterior, se ha señalado que la temperatura es una de las causas principales que impide que los HE alcancen su potencial de control (Milner et al., 2002). Debido a esto, la selección de aislados nativos adaptados a diversas condiciones agroclimáticas, enfatizando

en la temperatura puede ser una herramienta que facilite la selección de los mejores aislados para su implementación como controladores microbianos (Yeo et al., 2003; Meyling y Eilenberg, 2006; Chandra y Rahman, 2016).

Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos

Los hongos actúan por contacto, tienen mecanismos de acción únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula y la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico (Charnley y Collins, 2007). El proceso de infección consiste en los siguientes pasos:

1) Adhesión y germinación de la espora a la cutícula del hospedero

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la espora del primero es depositada sobre la superficie del segundo. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apesorio para comenzar la fase de penetración (Tanada y Kaya, 1993; Pedrini et al., 2007).

2) Penetración en el hemocele

La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, esclerotización, presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1992). Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración mediante la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma la capa cuticular rompiendo las áreas esclerosadas y agotan las fuentes de nitrógeno (Freimoser et al., 2003). Una vez dentro el hongo invade al insecto, debilitándolo y provocando su muerte. Posteriormente, tiene un crecimiento saprofito (Shapiro-Ilan et al., 2005).

Finalmente, la dispersión del HE depende de las características de la espora y el esporangio. Cada espora puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (Tanada y Kaya, 1993).

Mecanismos de defensa de los insectos

Los mecanismos de defensa de los insectos ante el ataque de los patógenos, se clasifican en barreras físico-químicas y sistema inmune innato (Meister et al., 1997; Elrod-Erickson et al., 2000; Levitin y Whiteway, 2008) y otras estrategias de defensa.

1) Barreras físico-químicas

La cutícula es la primera línea de defensa al ser una estructura rígida que recubre la parte externa del insecto conformada por dos capas: la epicutícula y la procutícula. La primera está compuesta principalmente por grasas, ceras y lipoproteínas, cuya función es evitar la pérdida de agua por la transpiración. La segunda es la más abundante ya que constituye el 95% de esta estructura y está compuesta de quitina y diversas proteínas estructurales que proporcionan rigidez, actuando como una barrera física a la penetración de los patógenos, además de ser difícilmente degradada por enzimas líticas excretadas por los mismos (Hajek y Leger, 1994). De manera general, en la cutícula se da la producción de proteasas, peptidasas antifúngicas e inhibidores de proteasas fúngicas que podrían tener un papel importante durante la infección, además de la presencia de ácidos grasos de cadena corta y lípidos cuticulares que inhiben la germinación de las esporas de los hongos (Dunn, 1991; Samuels y Paterson, 1995; Kachatourians, 1996; James et al., 2003).

2) Sistema inmune innato

La segunda línea de defensa de los insectos la constituye el sistema inmune innato conformado por el sistema celular y sistema humoral, capaz de reaccionar ante la invasión de patógenos. En este proceso participan los sistemas de reconocimiento de patrones moleculares característicos de polisacáridos microbianos presentes en la pared celular como: peptidoglicanos, liposacáridos y α -1,3 glucanos.

El sistema humoral utiliza proteínas antibióticas y otras moléculas efectoras que circulan en el hemocele y/o cutícula con la finalidad de inactivar los agentes patógenos que accedan al interior del insecto. Se ha descrito que los insectos sintetizan moléculas con acción biocida tales como cecropinas, defensinas, atacinas, lisozimas, entre otros (Boman et al., 1991). Se ha determinado la existencia de fenoloxidasas y hemaglutininas (lectinas) en la hemolinfa que podrían simular el papel de antígenos en combinación con proteínas depositadas en la superficie de los hospederos. Finalmente, una tercera modificación del comportamiento consiste en una interacción social alterada de grupos de individuos sanos con individuos infectados. El incremento del contacto entre individuos sanos con enfermos puede resultar en una “vacunación” colectiva de los individuos sanos, incrementando su inmunidad (Richard et al., 2008).

Bacterias promotoras de crecimiento

Las “rizobacterias” son aquellas bacterias que colonizan la raíz de las plantas y su zona de influencia (suelo rizosférico) (Kloepper, 1994 y 1996). Las Rizobacterias beneficiosas para las plantas son conocidas como PGPR por sus siglas en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”. Dentro de sus principales funciones se encuentran el incremento de la biodisponibilidad de elementos, el control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o de inducción de Resistencia Sistémica (van Loon et al., 1998) y la fitoestimulación al propiciar la emergencia o el enraizamiento de la planta. Las PGPR están asociadas a muchos tipos de plantas en diversos ambientes. En el proceso de colonización de la raíz o rizosfera la bacteria es atraída por quimiotaxis basada en compuestos presentes en exudados de la raíz, para posteriormente unirse a la superficie de esta.

La interacción entre plantas y PGPR se da mediante la fijación de nitrógeno (Mayz-Figueroa, 2004), solubilización de fosfatos (He et al., 2002) y producción de sideróforos (Fernández-Scavin y Pedraza, 2013) por parte de las bacterias, propiciando una mayor disponibilidad y posibilidad de absorción de nutrientes por la planta (Morrissey et al., 2004). Las PGPR ayudan a sintetizar hormonas como el ácido indol acético (IAA) o modular la producción de estas (Hol et al., 2014),

intervienen en la disminución de etileno en la planta. La inhibición de patógenos mediante competencia por nutrientes (Lugtenberg y Kamilova, 2009), producción de antibióticos, enzimas líticas (Van Loon, 1997) o productos volátiles (Kumar et al., 2012). Además, las PGPR pueden aumentar la tolerancia a contaminación por metales pesados al reducir la biodisponibilidad, absorción y transporte dentro de la planta (Dary et al., 2010) reducen el estrés por sequía y resistencia al estrés biótico (Grichko y Glick 2001; Saleem et al., 2007). Por otro lado, la planta les proporciona a los microorganismos del suelo exudados de la raíz que utilizan como sustratos y moléculas de señalización (Bais et al., 2006).

Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento

Fijación de nitrógeno

El Nitrógeno es esencial para el crecimiento de las plantas, formando parte de la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares; sin embargo, se encuentra de forma casi inactiva. Las PGPR juegan un papel importante en la disponibilidad de N_2 en el suelo, al fijar biológicamente este elemento en la forma de iones de amonio (NH_4^+) o nitratos (NO_3^-), que pueden ser asimilados por las plantas (Mayz-Figueroa, 2004). La fijación biológica de Nitrógeno es mediada por el complejo nitrogenasa, el cual cataliza la conversión del N_2 a NH_4^+ bajo la reacción general: $N_2 + 10H^+ + 8e^- + nMgATP \rightarrow 2NH_4^+ + H_2 + nMgADP + nPi$ ($n \geq 16$) (Halbleib y Luden, 2000). Por otra parte, las bacterias encuentran beneficio de la asociación al obtener carbono disponible de los exudados (Zahir et al., 2004).

Producción de Ácido indolacético

Los reguladores del crecimiento en las plantas son conocidos como hormonas vegetales; pequeñas moléculas que afectan el desarrollo y crecimiento vegetal a muy bajas concentraciones (García Breijo, 2008).

Las hormonas vegetales pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación en el crecimiento de las plantas. En estos grupos se incluyen auxinas, etileno, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico (Kamara, 2001).

La auxina típica es el ácido indol acético (AIA). Sin embargo, aún se conoce poco sobre los mecanismos de su expresión, metabolismo, transporte y distribución final. Esta hormona vegetal otorga beneficios a la planta dado que incrementa la división celular, lo cual se representa en un aumento de tamaño de los frutos y número de hojas (García Breijo, 2006).

El AIA es similar en estructura al aminoácido triptófano, y probablemente es éste el precursor del AIA formado en la planta viva. Se conocen cuatro vías para la formación de esta auxina (García Breijo, 2006). En las bacterias la producción de AIA se da a partir del triptófano por medio de la indol-acetamida que se encuentra implicada en la generación de tumores en la planta ó utilizando el ácido 3 indol pirúvico como intermediario (Figura 1) (Patten y Glick, 2002).

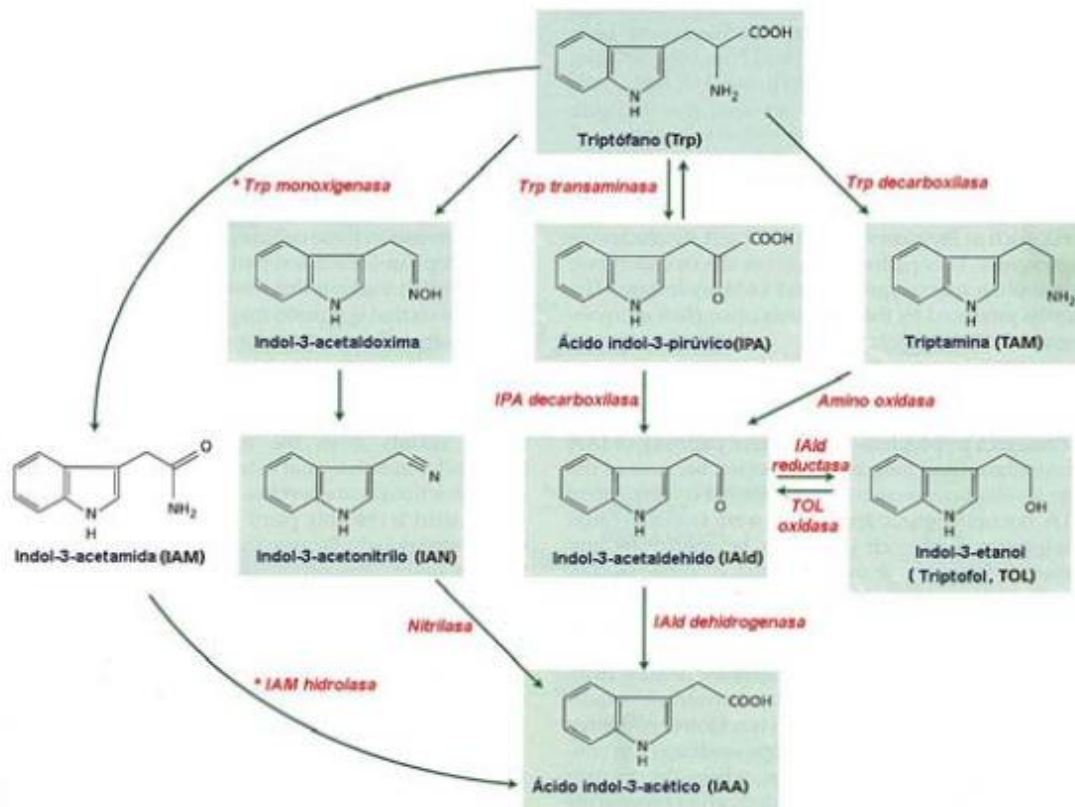


Figura 1. Biosíntesis del ácido indol acético (indol 3-acetato; auxina) a partir de triptófano en plantas y en bacterias; tomado de García Breijo, 2006.

Producción de Sideróforos

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos en el suelo (Neilands, 1995; Sánchez, 2006), que ayudan a quelar el hierro férrico de bajo peso molecular ($\text{Fe}(\text{III})$) y son sintetizados en condiciones de inanición de hierro mediante sintetasas peptídicas no ribosómicas (NRPS) o vías independientes de NRPS (Oves-Costales et al., 2009; Walsh y Marshall 2004). La mayoría de los sideróforos son excretados extracelularmente para unirse al $\text{Fe}(\text{III})$, y los complejos son recuperados por bacterias a través de receptores (Lee et al., 2012).

La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos para obtener el hierro, elemento necesario para llevar a cabo la fijación de N, ya que la enzima nitrogenasa, compuesta de varias unidades protéicas, requiere 36 átomos de hierro para su correcto funcionamiento (Sylvia, 2005).

Las bacterias aerobias y aerobias facultativas tienen una alta afinidad por los sistemas transportadores de hierro, razón por la cual se excretan sideróforos que auxilian la toma eficiente de este elemento (Jurkevitch et al., 1992). Los sideróforos son clasificados en catecoles e hidroxamatos, de acuerdo a los ligandos utilizados para quelar iones férricos (Louden et al., 2011; Figura 2).

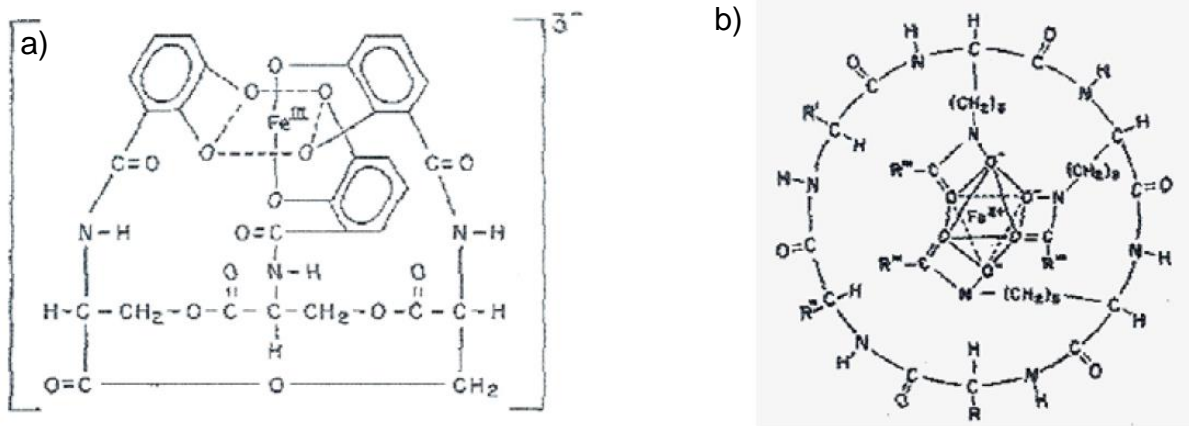


Figura 2. Estructura química de sideróforos. a) Estructura general de enterobactina férrica, un sideróforo tipo Catecol. b) Estructura general de ferricromo, un sideróforo tipo hidroxamato (Neilands, 1995)

Solubilización de fosfatos

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, y en suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. No es posible capturarlo biológicamente del aire como ocurre con el nitrógeno (Alexander, 1980; Nautiyal, 1999).

La solubilidad del P en el suelo es adecuada solamente si el P inorgánico lábil es solubilizado al menos tan rápidamente como las raíces pueden extraerlo del suelo (Russell, 1980). Cuando las plantas absorben el P del suelo, el P utilizado, es repuesto a partir de las formas lábiles y moderadamente lábiles de P inorgánico. Cuando estas fuentes están agotadas entonces la fuente de P no lábil es el factor que determina la concentración de P soluble en el suelo (Stewart & Sharpley, 1987). La concentración de P asimilable es muy baja, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg·kg⁻¹. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas, 2002).

Los microorganismos son fundamentales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo, ya que son posibles de manejar y prácticamente tienden a mantener el fósforo en sus estados de mayor disponibilidad, incrementando y manteniendo altas tasas de mineralización e inmovilización (Azcón & Barea, 1997, Atlas, 2002; Nautiyal et al., 2000). El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad para la planta de dicho elemento en el suelo, propiciando como consecuencia un incremento en el rendimiento de cosechas solubles (Chen et al., 2006).

Ventajas y desventajas del uso de hongos entomopatógenos y rizobacterias promotoras de crecimiento

Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son la causa más común de enfermedad de insectos en la naturaleza; se han reportado aproximadamente mil especies de hongos que matan insectos (pulgonos, chicharritas, mosca blanca, cucarachas, chapulines, entre otros (Leger y Wang, 2010). Si bien, los hongos entomopatógenos han resultado eficaces en varios insectos plaga, es importante considerar sus efectos secundarios sobre otros organismos no objetivo. Estudios realizados durante las últimas décadas han demostrado el potencial de hongos entomopatógenos para el control biológico (Rustiguel et al., 2017). A continuación, se describen algunas de las principales especies de hongos entomopatógenos utilizados en la agricultura.

Metarhizium spp.

Metarhizium anisopliae es un patógeno ubicuo de origen natural, que infecta a más de 200 especies de insectos (Abonyo et al., 2016). La acción de los HE sobre los insectos es a través de metabolitos secundarios y proteínas tóxicas, al respecto, en un estudio una destruxina obtenida de *M. anisopliae* se reportó como efectiva contra *Varroa destructor*, un parásito de las abejas (*Apis mellifera*). No obstante, la misma toxina purificada puede causar daño a abejas (Lodesani et al., 2017). En otro estudio, se caracterizó la Anisoplina obtenida de *Metarhizium anisopliae*, la cual mostró actividad ribonucleolítica y toxicidad contra las células de insectos (Olombrada et al., 2017), teniendo así aplicaciones de interés. En un estudio realizado por Fernández-Salas et al., (2019) en México, se reportó que el consorcio de hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Purpureocillium lilacinum* mostró efectividad en el control de larvas de garrapata (*Rhipicephalus microplus*).

Liao et al., (2014), destacaron el potencial de *Metarhizium spp.* contra artrópodos. Algunos estudios muestran los efectos de estas especies de hongos sobre organismos no objetivo. En Francia, se han presentado algunos casos de infecciones por parte de este género, entre ellos dos de queratitis ocular, uno a

causa de *M. guizhouense* (NAN01) (Dorin et al., 2015) y otro por parte de *M. robertsii* (CFD01) (Nourrisson et al., 2017). En otro caso una cepa de *M. robertsii* (LYO01) fue detectado en el seno en un trasplante de riñón (Nourrisson et al., 2017).

En animales, se han reportado algunos casos de infecciones por parte del género *Metarhizium*. Un estudio realizado en Siberia, Rusia este hongo causó micosis, colonización del hemocele, momificación y formación de conidias en los cadáveres de los insectos acuáticos *Cymatia coleoptrata*, *Sigara assimilis*, *Ilyocoris cimicoides* y *Notonecta reuteri* no objetivo (Belevich et al., 2017). En otro estudio realizado en Londres sobre organismos acuáticos, los resultados mostraron que los crustáceos *Daphnia* y *Artemia* son resistentes a *Metarhizium brunneum* comparados contra larvas de mosquitos *Culex* y *Anopheles* (Garrido-Jurado et al., 2016). Los insectos acuáticos son reguladores biológicos de las poblaciones de mosquitos, y se considera su influencia en las poblaciones de moluscos que transmiten helmintos (Brahma et al., 2014). Los resultados de otro estudio mostraron que *M. anisopliae* fue patogénico para los enemigos naturales *Chrysoperla carnea* y *Dicyphus tamaninii* (Thungrabeab y Tongma, 2007)

También existen estudios donde *M. anisopliae* no ha presentado efectos negativos contra organismos benéficos, como el realizado por Babendreier et al., (2015), donde no hubo efectos adversos sobre artrópodos de los órdenes díptera, araneae y hemiptera. En otro estudio, se encontró que el aislado *M. anisopliae* (ICIPE 30) se puede utilizar de forma segura para el combate de especies del género *Odontotermes*, ya que no muestra ningún efecto sobre las especies de hormigas *Crematogaster mimosae* y *Camponotus* sp. que interactúan con las termitas para las cuales se utiliza este hongo (Abonyo et al., 2016). La importancia ecológica de las hormigas en este caso, es que son depredadores eficaces de termitas (Gonçalves et al., 2005).

***Beauveria* spp.**

Se ha determinado que la especie *Beauveria bassiana* infecta alrededor de 700 especies de insectos (Zimmermann, 2007). En un estudio *in vivo* en Brasil, se extrajo la toxina Serum de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, resultando con mayor

toxicidad y potencial para aplicación en insectos plaga la extraída de *B. bassiana* (Rustiguel et al., 2017). Previamente, Khan et al., (2016), habían extraído la toxina Bb70p de *Beauveria bassiana*, la cual fue aplicada y la aplicaron via intra hemocelica a *Galleria mellonella* con resultados que mostraron alta mortalidad.

En otros estudios, se comprobó la capacidad de estos hongos para control biológico y promoción de crecimiento vegetal. Bamisile et al., (2019), mostraron el potencial de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* para manejo de *Diaphorina citri* y promoción de crecimiento de plantas de limón. Por otra parte, estudios desarrollados por Jaber y Enkerli (2017) indicaron que cepas de *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium brunneum* y *B. bassiana* endofita promovieron el crecimiento de plantas de haba (*Vicia faba*). De la misma manera, un estudio realizado en España demostró la capacidad de *B. bassiana* para promover el crecimiento al evaluarse en plantas de trigo (*Triticum spp*), como también para el manejo de larvas de *Spodoptera littoralis* en el cultivo de algodón. Canassa et al., (2019) encontraron que los hongos *Metarhizium robertsii* (ESALQ 1622) y *Beauveria bassiana* (ESALQ 3375) aumentaron el crecimiento en frijol (*Phaseolus vulgaris*) y fueron patógenicos para *Tetranychus urticae*.

En estudios sobre organismos no objetivo, se determinó la susceptibilidad de *Amblyseius swirskii* a *B. bassiana* cuando el hongo es aplicado directamente (Seiedy et al., 2015). La importancia de este ácaro radica en que se alimenta de varias especies de trips, moscas blancas, arañas rojas) y acaros (eriófididos), por lo que es utilizado como agente de control biológico (McMurtry et al., 2013). Actualmente son escasos los estudios donde se evalúa el efecto negativo de esta especie sobre organismos no objetivo.

Sin embargo, existen algunas investigaciones realizadas durante la década pasada. Un estudio en Tailandia descubrió que *B. bassiana* no es patógena para los depredadores *Coccinella septempunctata*, *Chrysoperla carnea* y *Dicyphus tamaninii* (Thungrabeab y Tongma, 2007). Por otra parte Wang et al., (2004) monitorearon cepas introducidas (exóticas) y nativas de *B. bassiana* durante un año, resultados mostraron que las cepas nativas no fueron desplazadas por las introducidas. En

otro estudio, se determinó que cepas introducidas de *Beauveria brongniartii* pueden coexistir con las cepas indígenas en el mismo hábitat (Castrillo et al., 2004). En la mayoría de estudios, se indica que *B. bassiana* tiene un amplio rango de hospederos con impacto mínimo sobre organismos no objetivo; Por su parte Zimmermann (2007), reitera que no se han observado efectos perjudiciales después de la aplicación de *B. bassiana* y *Beauveria brongniartii*.

El éxito de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico depende de la alta eficacia contra insectos plaga y de la baja virulencia contra insectos no objetivo (Thungrabeab y Tongma, 2007).

Bacterias promotoras de crecimiento

Las bacterias promotoras de crecimiento (PGPB), son organismos asociados a las raíces de las plantas que repercuten en el crecimiento y rendimiento de las plantas. Los géneros más comunes son *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Bhattacharyya y Jha, 2012). Entre los efectos directos de las bacterias a las plantas se encuentran: fijación biológica de nitrógeno, solubilización de complejos orgánicos o inorgánicos, movilización de hierro a través de la producción de sideróforos y la producción de hormonas reguladoras de crecimiento, como el ácido indol acético (AIA), la giberelina y la citoquinina (Lugtenberg y Kamilova, 2009). La promoción indirecta del crecimiento puede ocurrir a través del antagonismo, debido a antibióticos, actividad de enzimas líticas, o mediante la competencia por nutrientes, exclusión de nicho y resistencia sistémica inducida en plantas hospederas (Zandi y Basu, 2016).

***Enterobacter* spp.**

El género ha sido aislado de la rizósfera de varios cultivos y algunos estudios han demostrado su potencial para promover el crecimiento vegetal. Un estudio en Austria donde se aisló *Enterobacter* sp. (FD17) de la rizósfera de maíz (*Zea mays*), produjo *in vitro* ácido indol-3-acético (AIA), sideróforos y la enzima ACC desaminasa; en invernadero se demostró el endofitismo de esta cepa y la capacidad de promover el crecimiento en este mismo cultivo, ya que la biomasa de la planta,

el número de hojas por planta, el área de la hoja y el rendimiento de grano fue mayor en 39%, 14%, 20% y 42%, respectivamente (Naveed et al., 2014). En otro estudio, *Enterobacter cloacae* (MSR1) aislada de las raíces no nodulares de alfalfa (*Medicago sativa*) en Arabia Saudita, presentó *in vitro* características de solubilizar fósforo, producción de fitohormonas y compuestos bioactivos; en la evaluación en maceta, las plantas inoculadas mostraron mayor longitud y peso seco (Khalifa et al., 2016).

De acuerdo a los resultados de Kim et al., (2014), *Enterobacter* sp. (EJ01), aislada de la rizósfera de Rosa china de mar (*Dianthus japonicus thunb*), fue capaz de colonizar la rizósfera y endosfera de las raíces de *Arabidopsis*, producir ACC desaminasa y AIA; en invernadero confirió aumentos en peso fresco y seco, como también aumentó la altura de *Arabidopsis* y tomate (*Solanum lycopersicum*), en condiciones normales y alta salinidad. A nivel molecular, el tratamiento en *Arabidopsis* aumentó la expresión de genes sensibles al estrés (DREB2b, RD29A, RD29B y RAB18).

Estudios realizados por Habib et al., (2016), mostraron que *Enterobacter* sp. (UPMR18), aislada de suelos cultivados, mejoraron la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de okra (*Abelmoschus esculentus*) bajo estrés por salinidad

Otros estudios han reportado algunas especies de este género como patógenas para humanos (Cuadro 2). Las especies de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter hormaechei*, son las más frecuentemente aisladas de especímenes clínicos (Davin-Regli, 2015). En las últimas tres décadas, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* fueron reportadas como bacterias patógenas oportunistas en hospitales de Europa durante brotes de infección, ha sido aislada de las vías respiratorias, urinarias, sanguíneas y gastrointestinales (Langley et al., 2001). La capacidad de infección puede deberse a la producción de biofilms y las citotoxinas secretoras (enterotoxinas, hemolisinas, toxinas formadoras de poros; Mezzatesta et al., 2012). Existe un reporte de edema pulmonar causado por la especie *Enterobacter*

cloacae en Reino Unido (Blundell y Mason, 2015). En España, otro estudio reportó inflamación de la vesícula causada por la misma especie (Isasti et al., 2009).

***Chryseobacterium* spp.**

El género *Chryseobacterium* fue descrito en 1994 por Vandamme et al. (1994), incluye más de 100 especies (Cools et al., 2019) encontradas en varios ambientes incluyendo agua dulce (Strahan et al., 2011), suelo (Li y Zhu, 2012), rizósfera (Cho et al., 2010), filosfera (Behrendt et al., 2007), lodo (Pires et al., 2010), pescado (Zamora et al., 2012), intestino de insectos (Kämpfer et al., 2010), productos lácteos (Hantsis-Zacharov et al., 2008), pollo crudo (de Beer et al., 2005), plantas industriales (Herzog et al., 2008) y muestras clínicas (Yassin et al., 2010).

Esta bacteria ha demostrado características de promover el crecimiento y bioremediación. En un estudio desarrollado en la India, cepas de *Chryseobacterium* sp. (PSR 10) con capacidad de solubilizar fósforo se inocularon en semillas de mijo (*Eleusine coracana*), los resultados mostraron mejora en el crecimiento de las plantas inoculadas, contenido de clorofila y actividad de la enzima nitrato reductasa (Veer y Goel, 2015). De la misma manera, en otro estudio en la India, donde se aisló *Chryseobacterium* sp. (PSR10) de la rizósfera de soya (*Glycine max*), los resultados mostraron que la inoculación de esta cepa sobre semillas de lenteja (*Lens culinaris*), en combinación con dosis del 50% de nitrógeno y fósforo (cantidades utilizadas comúnmente), el crecimiento, contenido de clorofila, actividad de nitrato reductasa, fósforo y rendimiento de cultivo fueron mayores significativamente comparados con el control (Singh et al., 2018).

Además de la promoción de crecimiento, *Chryseobacterium* ha demostrado potencial en biorremediación y control biológico. De acuerdo a lo encontrado por Qu et al., (2015) la cepa PYR2 de *Chryseobacterium* sp. fue capaz de degradar varios plaguicidas organoclorados, utilizándolos como fuente de carbón para su desarrollo. Esta cepa degradó 80 a 98% de hexaclorociclohexano (HCH) o 50mg*L⁻¹ de 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil) -etano (DDT) en 30 días, por lo que se propone el uso de estas cepas para bioremediación de suelos contaminados. En cuanto al potencial de control biológico, un estudio encontró que cepas de *Chryseobacterium*

nematophagum, resultaron patógenas para nematodos fitopatógenos (Page et al., 2019).

A pesar de que *Chryseobacterium indologenes* se ha descrito como un microorganismo que raramente causa enfermedades en humanos (Olbrich et al., 2014), recientemente, se han reportado varios casos. En la India, reportaron la asociación de esta bacteria con neumonía provocada a una lactante de 3 meses de edad (Das et al., 2017), así como un caso de meningitis neonatal en la India (Eshwara et al., 2014). En España, otro estudio reportó el primer caso de infección en el sistema nervioso central por parte de esta bacteria (Olbrich et al., 2014).

***Exiguobacterium* spp.**

El género *Exiguobacterium* fue descrito por primera vez por Collins et al., (1983). Presenta 17 especies reconocidas, que crecen en un amplio rango de temperaturas y pH (Kasana et al., 2018). Las especies de *Exiguobacterium* se han aislado de una gran variedad de muestras, tales como suelos, sedimentos, agua de mar, permafrost, glaciares, efluentes industriales y respiraderos hidrotermales (Rodríguez et al., 2006; Chaturvedi y Shivaji, 2006; Crapart et al., 2007; Kasana y Yadav SK, 2007; Alam y Malik, 2008; Dhanve et al., 2009; Singh et al., 2013; Dastager et al., 2015), como también de nódulos de raíces de leguminosas, demostrando su capacidad endófito (De Meyer et al., 2015). El rasgo distintivo de los aislamientos que pertenecen a este género es su capacidad para crecer en condiciones ambientales extremas, con temperaturas que varían de 12 a 55°C en situaciones limitantes de nutrientes (Vishnivetskaya et al., 2009).

En esta década, los investigadores han explotado este género con atributos para la promoción del crecimiento en varios cultivos (Ramesh et al., 2014), así como biorremediación. Un estudio en el que se aisló *Exiguobacterium* sp. (EM9) de un volcán de barro y cuevas de piedra caliza en la India; mostró efecto antagonista contra cuatro patógenos de plantas y propiedades promotoras de crecimiento como producción de AIA, y Cianuro de hidrógeno (HCN), solubilización de fósforo, producción de sideróforos y enzimas hidrolíticas. La inoculación de esta cepa en semillas de Chile (*Capsicum annuum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), dio como

resultado un mayor porcentaje de emergencia de plántulas, longitud de raíz y peso de la planta. Además, la co-inoculación con la bacteria *Pantoea agglomerans* (OM5) dio un efecto pronunciado sobre la emergencia de las plántulas, número de raíces secundarias, la longitud de la raíz primaria y longitud del tallo, (Venkadesaperumal et al., 2014), lo que demostró el potencial del uso de consorcios microbianos.

La cepa *Exiguobacterium acetylicum* (1P) aislada de suelo rizosférico de manzana (*Malus domestica*) en la India, fue capaz de solubilizar fósforo, producir ácido indol acético, sideróforos y HCN; al inocularse en las semillas de trigo (*Triticum*) en invernadero, se reflejó en aumentos del 16.54 y 8.16% en una mayor longitud de las raíces y brotes, respectivamente, en comparación con un control no inoculado (Selvakumar et al., 2010). En otro estudio, *Exiguobacterium* sp. (MH3) aislada de la rizósfera de lentejas de agua (*Lemna minor*) aumentó el número de frondas y de peso seco en un 30%. Además, ayudó a bajar los niveles de estrés al prevenir la absorción excesiva de cromo (Tang et al., 2015), demostrando así su capacidad para biorremediación. En India, una cepa de *Exiguobacterium oxidotolerans* (STR6) aislada de suelo salino, se inoculó en plantas de Verdolaga (*Bacopa monnieri*) y los resultados mostraron que hubo un aumento en el rendimiento de las plantas de 109 y 138%, como también se registraron 36 y 76% más compuestos tipo bacoside-A, todo en las dos condiciones de salinidad (Bharti et al., 2013). Además de su capacidad para promover el crecimiento, el género *Exiguobacterium* ha demostrado otras aplicaciones. La cepa *Exiguobacterium mexicanum* (PR 10.6) aislada en Inglaterra, ha sido utilizada para la síntesis de nanopartículas de plata (Padman et al., 2014). La cepa *Exiguobacterium* sp. (VSG-1) logró producir bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y producir algunas enzimas líticas como celulasa, pectinasa, mananasa, xilanasa y tanasa (Vijayalaxmi et al., 2013). En lo referente a biorremediación, la cepa *Exiguobacterium* sp. (PMA) demostró su potencial para degradar 4-cloroindol de sitios contaminados y utilizarlo como su única fuente de carbono y energía (Arora y Bae, 2015).

Las especies de bacterias de este género rara vez están asociadas con infecciones en humanos, no obstante, hay estudios que demuestran lo contrario. En China, se

reportó el primer caso de un adulto con neumonía y bacteriemia provocado por *Exiguobacterium* spp. (Chen et al., 2017). En España, un caso de infección cutánea producida por *Exiguobacterium sibiricum* (Tena et al., 2014). A pesar de que en años recientes se han presentado pocos casos de bacteriemia en el sistema nervioso central provocado por *Exiguobacterium*, se presentó el primer reporte en China de un paciente con síntomas de esta infección causado por *Exiguobacterium profundum* junto con la bacteria *Nocardia terpenica* (Hu et al., 2018).

***Pseudomonas* spp.**

El género *Pseudomonas* fue descrito por Migula en 1984 (Slabbinck et al., 2010), se puede encontrar en suelos agrícolas y han sido utilizadas como biofertilizantes, por ser capaces de mejorar el rendimiento de los cultivos mediante mecanismos directos e indirectos (Walsh et al., 2001), siendo *Pseudomonas Fluorescentes* spp. la especie mas estudiada que promueve el crecimiento vegetal (Sivasakthi et al., 2014). Un estudio donde se aislaron siete cepas de *Pseudomonas Fluorescentes* de raíces, brotes y rizósfera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), fueron evaluadas sobre la misma planta, los resultados mostraron aumento en la altura de brotes, masa fresca y seca (Mehnaz et al., 2009). En otro estudio de Uzbekistán, las cepas bacterianas *Pseudomonas* sp. (NUU1) y *Pseudomonas fluorescens* (NUU2) inoculadas en trigo (*Triticum*), estimularon significativamente el brote, aumentaron la longitud de la raíz y el peso seco (Egamberdieva, 2010). Por su parte Susilowati et al., (2015) evaluaron *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas knackmussii*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas knackmussii Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *Pseudomonas mosselii*, las cuales demostraron su capacidad para promover el crecimiento en términos de fijación de nitrógeno, producción de AIA y solubilización de fósforo. Los resultados de otro estudio mostraron que las bacterias endófitas de pasto (*Miscanthus giganteus*) *Pseudomonas fluorescens* (L111, L228 y L321), tuvieron la capacidad de solubilizar fósforo, y al inocular estas cepas en plantas de chicharo (*P. sativum*) tuvieron efectos de promoción de crecimiento (Otieno et al., 2015).

Generalmente, *Pseudomonas fluorescens* no se considera un patógeno bacteriano en humanos. Sin embargo, algunos estudios lo han identificado en niveles bajos en varias partes del cuerpo. Se ha encontrado que *P. fluorescens* puede causar bacteremia en los seres humanos, y la mayoría de los casos reportados se pueden atribuir a la transfusión de hemoderivados contaminados o al uso de equipos contaminados asociados con infusiones intravenosas. Aunque no se considera que sea un agente etiológico de la enfermedad pulmonar, existen varios informes que lo identifican en muestras respiratorias. También se sospecha que tiene alguna relación con la enfermedad de Crohn, ya que aproximadamente el 50% de los pacientes con esta enfermedad, desarrollan anticuerpos séricos contra *P. fluorescens* (Scales et al., 2014). Otra especie también denominada patógena oportunista es *Pseudomonas aeruginosa*, capaz de infectar a humanos y causar enfermedad pulmonar grave, siendo uno de los principales patógenos asociados con infecciones nosocomiales (Alhazmi, 2015).

***Acinetobacter* spp.**

En 1974, el género *Acinetobacter* consistía en una especie, *A. calcoaceticus*, que luego se subdividió en las subespecies *A. calcoaceticus* var *anitratius* y *A. calcoaceticus* var *lwoffii* (Peleg et al., 2008). A la fecha, este género consiste en 23 especies con nombres válidos (Nemec et al., 2011).

Estudios han demostrado el potencial del género *Acinetobacter* para promover el crecimiento vegetal. La cepa *Acinetobacter* sp. (RSC7) aislada de la rizósfera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en experimentos *in vitro* demostró la capacidad para solubilizar fósforo, producción de AIA y sideróforos; la inoculación en semillas produjo un mayor crecimiento de plántulas de *Vigna radiate*, *Vigna unguiculata*, *Abelmoschus esculentus*, *Dolichos lablab* (Prittish et al., 2017). En otro estudio, en el que se inoculó a *Acinetobacter calcoaceticus* (P23) en plantas de lenteja de agua (*Lemna minor*) y lechuga (*Lactuca sativa*), se encontró que incrementó el contenido de clorofila (Suzuki et al., 2014).

A pesar de sus efectos positivos en las plantas, se ha documentado al género *Acinetobacter* como uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales,

siendo asociado con la creciente aparición de epidemias y se ha convertido en una preocupación en los hospitales (Almasaudi, 2018). La especie *Acinetobacter baumannii* se ha descrito como un patógeno nosocomial oportunista y uno de los seis microorganismos resistentes a múltiples medicamentos más importantes en hospitales a nivel mundial, responsables a una vasta gama de infecciones, neumonía asociada al ventilador e infecciones de la sangre, siendo las que comúnmente contribuyen a una tasa de mortalidad que puede llegar hasta de un 35 % (Antunes et al., 2014). Según Elhosseiny y Attia (2018), *Acinetobacter baumannii* se ha convertido en una pesadilla en los hospitales en los últimos años, ubicado como el primero de la lista de prioridad de patógenos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el desarrollo de nuevos antibióticos. En un estudio realizado en Brasil, más de la mitad de una muestra de 141 personas en hospital, resultaron con infecciones en sangre, neumonía, herida de cirugía, tracto urinario, piel y tejidos blandos causados por *Acinetobacter* spp. (Leão et al., 2016).

***Stenotrophomonas* spp.**

La cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* fue inicialmente descrita como *Pseudomonas maltophilia* in 1961. Posteriormente fue agrupada en el género *Xanthomonas* antes de que se renombrara como *Stenotrophomonas* en 1993, siendo el aislado clínico *Stenotrophomonas maltophilia* (K279a) la primera publicación de esta especie (Shi-qi y Berg, 2018). Los miembros de esta especie cosmopolita son comunes en agua y suelos, incluyendo la rizósfera, aunque se puede encontrar en una variedad de ambientes como hospitales, cuartos limpios y alimentos lavados (Sánchez, 2015). Los beneficios de esta bacteria se han asociado a la promoción de crecimiento y salud de las plantas, así como participando en los ciclos de azufre y nitrógeno y en la degradación de compuestos complejos y contaminantes (Shi-qi y Berg, 2018), y como efectos negativos se ha descrito como un patógeno oportunista humano (Sánchez, 2015).

En un estudio realizado en México, se encontró que la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* (CR71) presentó acción antagonista contra *Botrytis cinerea* por emisión de compuestos orgánicos volátiles y en invernadero promovió el brote y la longitud

de la raíz, el contenido de clorofila y el peso fresco total de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv *Saladette*). Sin embargo, un mejor efecto se observó cuando se inoculó junto con la cepa *Pseudomonas stutzeri* (E25) (Rojas-Solís et al., 2018). En otro estudio, *Stenotrophomonas maltophilia* (SBP-9) aislado de la rizósfera de sorgo (*Sorghum bicolor*), en experimentos *in vitro* produjo ACC desaminasa, ácido giberélico, AIA, sideróforos y solubilización de fosfato inorgánico; resultados positivos también se encontraron en estudio en invernadero, donde aumentó significativamente el crecimiento de la planta en términos de diversos parámetros como la longitud del brote/longitud de la raíz (20–39%), peso fresco/peso seco (28–42%), y Contenido de clorofila (24–56%) (Singh y Jha, 2017).

Aunado a esto, se ha encontrado que esta bacteria puede utilizarse para el control de microorganismos patógenos. Un estudio en China demostró que *Stenotrophomonas maltophilia* (P28) produce la bacteriocina llamada maltocina, que tiene una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, demostrando actividad lítica contra varias bacterias patógenas (Dong et al., 2015). De acuerdo a Mukherjee y Roy (2016), esta especie tiene la capacidad de producir enzimas para aplicaciones biotecnológicas como degradación de atrazina, queratina, tricloroetileno y diclorodifeniltricloroetano (DDT), y su uso en la biorremediación de metales pesados. En Egipto, un estudio *in vivo* e *in vitro* en el que se aisló *Stenotrophomonas maltophilia* (PD4560) de la rizósfera de berenjena (*Solanum melongena*), demostró la actividad proteolítica de contra la bacteria *Ralstonia solanacearum* que ataca al cultivo de papa (*Solanum tuberosum*), atribuyendo esta actividad de biocontrol a la producción de enzimas proteolíticas de Serina (Elhalag et al., 2016).

En lo referente a la patogenicidad de esta bacteria en los humanos, se ha determinado que, aunque es un patógeno de baja virulencia, *S. maltophilia* puede causar varias infecciones en pacientes susceptibles, como también presenta resistencia intrínseca a algunos antibióticos (Sánchez, 2015), pudiendo prevalecer en unidades de cuidados intensivos, poblaciones pediátricas y en infecciones adquiridas en la comunidad (Chang et al., 2015). Estudios de caso han determinado

a esta especie colonizador cada vez más frecuente de pulmones de los pacientes con fibrosis quística; además de tener la capacidad de adherirse y formar biofilms en diferentes superficies, incluidas las abióticas como las de los catéteres y prótesis (Shi-qi y Berg, 2018). Algunos estudios de caso han reportado el aislamiento de esta especie de pacientes que llegan al hospital con un cuadro complejo de otras patologías. En Japón, se aisló *S. maltophilia* de abscesos intraabdominales (Sawai et al., 2017), en Brasil un caso de neumonía (Geller et al., 2018) y en Estados Unidos endocarditis (Shah et al., 2018), causados por esta misma especie

***Bacillus* spp.**

Bacillus se ha descrito como el género de bacterias más abundante en la rizósfera. Algunas especies de este género han sido reconocidas desde hace años por su actividad como promotoras de crecimiento (Sivasakthi et al., 2014). En una investigación desarrollada en Alemania, se inoculó *Bacillus amyloliquefaciens* (FZB42) en lechuga (*Lactuca sativa*) y los resultados mostraron un aumento en el crecimiento de este cultivo y colaboró en la salud al reducir la gravedad de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani*, a través de la producción de lipopéptidos y polipéptidos (Kröber et al., 2014). *Bacillus megaterium* ha sido otra especie que se ha determinado capaz de producir sideróforos (Santos et al., 2014). Las cepas *Bacillus megaterium* (R181), *B. safensis* (R173), *B. simplex* (R180) y *Paenibacillus graminis* (R200), aisladas de la rizósfera de trigo (*Triticum*), aumentaron el crecimiento del maíz (*Zea mays*), soya (*Glycine max*) y trigo (*Triticum*) en condiciones de invernadero (Akinrinlola, 2018).

En cuanto a riesgos a la salud, la mayoría de las especies del género *Bacillus* no se consideran patógenos para humanos. Sin embargo, se han reportado infecciones por parte de algunas especies. En Corea, se presentó una inusual bacteriemia y mediastinitis debidas a la co-infección con *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, en un paciente con perforación esofágica (La Jeon et al., 2012). A pesar de que *Bacillus pumilus* rara vez se asocia con infecciones clínicas graves, ha sido causa de algunas infecciones. Un reporte de caso en Canadá, reveló artritis séptica causada por *Bacillus pumilus* y se presume que la infección se adquirió en un viaje

a África. Sin embargo, este organismo rara vez causa infecciones graves y solo se había descrito en recién nacidos e individuos inmunocomprometidos o como una infección de la piel (Shivamurthy et al., 2016). Otro reporte de caso en Grecia, reveló infección causada por esta misma especie en dos recién nacidos, una en un bebé femenino sin factores que la predisponen a la infección y el otro en un niño varón que requirió ventilación mecánica y un catéter intravenoso, demostrando el potencial de *B. pumilus* como patógeno del torrente sanguíneo durante la infancia (Kimouli et al., 2012). Un caso de Sepsis y artralgia en un paciente inmunocompetente fue reportado en Bulgaria, causado por la especie *Bacillus licheniformis*, reconocido como un patógeno humano que causa infecciones (Haydushka et al., 2012).

En cuanto a patogenicidad en animales, un estudio en China encontró que la cepa *Bacillus subtilis* (HFBF-B11) es un patógeno oportunista de patitos al co-infectar con la bacteria *Riemerella anatipestifer*. Los animales demostraron lesiones hepáticas y trastornos de la barrera hematoencefálica que llevaron a infecciones y daños cerebrales con una tasa de mortalidad del 100% (Zhu et al., 2017).

Conclusiones y perspectivas

De acuerdo a los estudios realizados y reportes de caso, las bacterias PBPR actúan de manera oportunista, ya que infectan a personas inmunocomprometidas, que llegan al hospital muchas veces con un sin número de otras patologías. Sin embargo, no se puede descartar el riesgo de utilizarlas, por lo que es recomendable utilizar siempre el equipo adecuado en caso de manipularlas. En el caso de los hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, en general se ha encontrado que son inocuos para organismos no objetivo. Sin embargo, son necesarias más investigaciones de este tipo para determinar los efectos sobre organismos no objetivo de diversos agroecosistemas, incluyendo los organismos benéficos del lugar donde se pretendan aplicar.

Literatura citada

Abonyo, E. A., Maniania, N. K., Warui, C. M., Kokwaro, E. D., Palmer, T. M., Doak, D. F., & Brody, A. K. (2016). Effects of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* on non-target ants associated with *Odontotermes* spp. (Isoptera: Termitidae) termite mounds in Kenya. *International journal of tropical insect science*, 36(3): 128-134.

Agarwal, G.P. (1990). Entomogenous fungi in India and management of insect pests. *Indian Phytopathol.* 43:131-142.

Agler, M.T., J. Ruhe, S. Kroll, C. Morhenn, S. T. Kim, D. Weigel and E. M. Kemen. (2016). Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biol.* 14:1-31.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1): 1-20.

Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science.* 26(1): 1-20.

Akinrinlola, R.J. (2018). Evaluation of bacillus strains for plant growth-promotion potentials on corn (*Zea mays*), wheat (*Triticum aestivum*), and soybean (*Glycine max*).

Alam MZ, Malik A. Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. (2008). ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. *J Basic Microbiol.*;48:416–420.

Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*-pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2): 44.

Almasaudi, S. B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi journal of biological sciences*, 25(3): 586-596.

Altre, J.A., J.D. Vandenberg and F.A. Cantone, (1999). Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to Diamondback Moth, *Plutella xylostella*: Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *J Invertebr Pathol.* 73(3): 332-338.

Antonello VS, Daht P, Polli J, Gross M, Jr, Colvero M. (2017). Ventilator-associated pneumonia in neonatal intensive care unit due to *Chryseobacterium indologenes*. *Pediatr Infect Dis J.* 36:e353–e355.

Antunes, L. C., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis* 71: 292–301.

Arora, P. K., and Bae, H. (2015). Biodegradation of 4-chloroindole by *Exiguobacterium* sp. PMA. *Journal of hazardous materials*, 284: 261-268.

Atıcı S, Ünkar ZA, Erdem K, Kadayifci EK, Karaaslan A, Memis,og̃lu AC, Soysal A, Toprak NU, Söyletir G, Özek E, Bakır M. (2016). Ventilator-associated pneumonia caused by *Chryseobacterium indologenes*: a rare infant case and review of the literature. *Springerplus.* 5: 1741.

Aykac K, Ozsurekci Y, Tuncer O, Sancak B, Cengiz AB, Kara A, Ceyhan M. (2016). Six cases during 2012-2015 and literature review of *Chryseobacterium indologenes* infections in pediatric patients. *Can J Microbiol.* 62: 812–819.

Babendreier, D., Jeanneret, P., Pilz, C., & Toepfer, S. (2015). Non-target effects of insecticides, entomopathogenic fungi and nematodes applied against western corn rootworm larvae in maize. *Journal of Applied Entomology.* 139(6): 457-467.

Bais, H. P, T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy and J. M. Vivanco. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 233–266.

Bamisile, B. S., Dash, C. K., Akutse, K. S., Qasim, M., Ramos Aguila, L. C., Wang, F. & Wang, L. (2019). Endophytic *Beauveria bassiana* in Foliar-Treated Citrus limon

Plants Acting as a Growth Suppressor to Three Successive Generations of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Insects*, 10(6): 176.

Baumgartner, K. (2006). The role of beneficial mycorrhizal fungi in grapevine nutrition. *ASEV Tech Update* 1:3.

Behrendt, U., Ulrich, A., Spröer, C., Schumann, P. (2007) *Chryseobacterium luteum* sp. nov., associated with the phyllosphere of grasses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1881–1885.

Belevich, O. E., Yurchenko, Y. A., Glupov, V. V., & Kryukov, V. Y. (2017). Effect of entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii* on non-target organisms, water bugs (Heteroptera: Corixidae, Naucoridae, Notonectidae). *Applied entomology and zoology.* 52(3): 439-445.

Bharti, N., Yadav, D., Barnawal, D., Maji, D., & Kalra, A. (2013). *Exiguobacterium oxidotolerans*, a halotolerant plant growth promoting rhizobacteria, improves yield and content of secondary metabolites in *Bacopa monnieri* (L.) Pennell under primary and secondary salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2): 379-387.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4): 1327-1350.

Bhattacharyya, P. N., and D. K. Jha. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 28 (4): 1327-1350.

Blundell, H. J., & Mason, C. A. (2015). *Enterobacter cloacae* pericardial effusion in a frail elderly patient. *Case Reports.* bcr2014207025.

Bojórquez, A. D. A., C.G. Gutiérrez, J.R.C. Báez, M.Á.A, Sánchez, L.G. Montoya and E.N. Pérez (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra

Ximhai: *Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*; 6(1): 51-56.

Boman, H.G., I. Faye, G.H. Gudmundsson, J.Y. Lee, D.A. Lidholm (1991). Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry* 201: 23-31.

Brahma, S., Aditya, G, Sharma, D. Saha, N. Kundu, M. Saha, G. K. (2014) Influence of density on intraguild predation of aquatic Hemiptera (Heteroptera): implications in biological control of mosquito. *J Entomol Acarol Res.* 46: 6–12.

Bugeme, D. M., N. K. Maniania, M. Knapp and H. I. Boga (2008). Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. In *Diseases of Mites and Ticks*, pp. 275-285. Springer, Dordrecht.

Canassa, F., Tall, S., Moral, R. A., de Lara, I. A., Delalibera Jr, I., & Meyling, N. V. (2019). Effects of bean seed treatment by the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* on plant growth, spider mite populations and behavior of predatory mites. *Biological Control*, 132: 199-208.

Castrillo, LA, Griggs MH, Vandenberg JD. (2004). Vegetative compatibility groups in indigenous and massreleased strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* : likelihood of recombination in the field. *Journal of Invertebrate Pathology* 86: 2637.

Chandra Teja, K. N. P. and S. J. Rahman, (2016). Characterisation and evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains for their temperature tolerance. *Mycology.* 7(4): 171-179.

Chang, Y. T., Lin, C. Y., Chen, Y. H., and Hsueh, P. R. (2015). Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in microbiology.* 6: 893.

Charnley, A. K. (1992). Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. In: Lomer, C.J., C. Prior (eds.), *Biological control of locusts and grasshoppers*. Melkshan, UK: CAB International. pp. 191-190.

Charnley, A.K., S.A. Collins, (2007). *Entomopathogenic fungi and their role in pest control*.

Chaturvedi P, Shivaji S. (2006). *Exiguobacterium indicum* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56:2765–2770.

Chen, X., Wang, L., Zhou, J., Wu, H., Li, D., Cui, Y., & Lu, B. (2017). *Exiguobacterium* sp. A1b/GX59 isolated from a patient with community-acquired pneumonia and bacteremia: genomic characterization and literature review. *BMC infectious diseases*. 17(1): 508. doi:10.1186/s12879-017-2616-1.

Cho, S. H., Lee, K. S., Shin, D.S., Han, J. H., Park, K. S., Lee, C. H., Park, K. H., Kim, S. B. (2010). Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaera* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol*. 33: 122–127.

Collins, M. D, Lund B. M, Farrow J. A, Schleifer K. H. (1983). "Chemotaxonomic study of an alkaliphilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen nov., sp. nov". *J. Gen. Microbiol*. 129 (7): 2037–2042. doi:10.1099/00221287-129-7-2037.

Cools, P., Kämpfer, P., Nemeč, A., and Vaneechoutte, M. (2019). *Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods*. In *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press.

Cosoveanu, A, Cabrera, Y. Hernandez, G. Cabrera, R. (2014). Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopathogenic fungi. *Intl J Agri Crop Sci*. 7: 1497–1503.

Crapart, S, Fardeau, M. L. Cayol, J. L. (2007). *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 287–292.

Dary, M., M. A. Chamber-Perez, A. J. Palomares, E. Pajuelo. (2010). “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater.* 177: 323–330.

Das, P., Karade, S., Kaur, K., Ramamurthy, R., and Ranjan, P. (2017). *Chryseobacterium indologenes* pneumonitis in an infant: a case report. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(6), DD07.

Dastager SG, Mawlankar R, Sonalkar VV, et al. *Exiguobacterium enclense* sp. nov., isolated from sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65:1611–1616.

Davin-Regli, A. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology.* 6: 392.

de Beer, H., Hugo, C. J., Jooste, P. J., Willems, A., Vancanneyt, M., Coenye, T., Van-damme, P. A. R. (2005). *Chryseobacterium vrystaatense* sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2149–2153.

De Meyer S. E., De Beuf K, Vekeman, B. Willems, A. (2015). A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 83:1–1.

Dhanve, R. S., Kalyani, D. C. Phugare, S. S. (2009). Coordinate action of exiguobacterial oxidoreductive enzymes in biodegradation of reactive yellow 84A dye. *Biodegradation.* 20:245–255.

Dong, H., Zhu, C., Chen, J., Ye, X., and Huang, Y. P. (2015). Antibacterial Activity of *Stenotrophomonas maltophilia* Endolysin P28 against both Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Frontiers in microbiology.* 6: 1299.

Dunn, P. E., (1991). Insect antibacterial protein. In: Warr, G.W., N. Cohen (eds.), *Phylogenesis of Immune Function*. Plenum Press. Boca Raton, Florida. pp 19-44.

Egamberdieva, D. (2010). Growth response of wheat cultivars to bacterial inoculation in calcareous soil. *Plant, Soil and Environment*. 56(12): 570-573.

Elhalag, K. M., Messiha, N. A. S., Emara, H. M., & Abdallah, S. A. (2016). Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions. *Journal of applied microbiology*, 120(6): 1629-1645.

Elhosseiny, N. M., & Attia, A. S. (2018). *Acinetobacter*: an emerging pathogen with a versatile secretome. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-15.

Elrod-Erickson, M., S. Mishra, D. Schneider, (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology* 10:781-784.

Eshwara VK, Sasi A, Munim F, Purkayastha J, Lewis LE, Mukhopadhyay C. (2014). Neonatal meningitis and sepsis by *Chryseobacterium indologenes*: a rare and resistant bacterium. *Indian J Pediatr*. 81: 611–613.

Fernández-Salas, A., Alonso-Díaz, M. A., & Alonso-Morales, R. A. (2019). Effect of entomopathogenic native fungi from paddock soils against *Rhipicephalus microplus* larvae with different toxicological behaviors to acaricides. *Experimental parasitology*, 107729.

Fernández-Scavin, A., and R. O. Pedraza. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A (eds) *Bacteria in agrobiolology: crop productivity*. Springer, Heidelberg, pp 265–285.

Freimoser, F.M., A. Grundschober, U. Tuor, M. Aebi (2003). Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. *FEMS Microbiology Letters* 222: 281-287.

García Breijo F.J. (2003). Biología y Botánica, Parte III: El Funcionamiento de las Plantas. Universidad Politécnica de Valencia. [on line] <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/programa.htm> (consultada: 12 de noviembre de 2019)

Garrido-Jurado I, Alkhaibari A, Williams SR, Oatley-Radcliffe DL, Quesada-Moraga E, Butt T. M. (2016). Toxicity testing of *Metarhizium* conidia and toxins against aquatic invertebrates. *J Pest Sci* 89(2): 557–564. doi:10.1007/s10340-015-0700-0.

Geller, M., Nunes, C. P., Oliveira, L., and Nigri, R. (2018). *S. maltophilia* pneumonia: A case report. *Respiratory medicine case reports*. 24: 44-45.

Gonçalves, T. T., Reis Júnior, R., Souza, O. F. F. D., and Ribeiro, S. P. (2005). Predation and interference competition between ants (Hymenoptera: Formicidae) and arboreal termites (Isoptera: Termitidae).

González Gaona, E., Borja Bravo, M., Reyes Muro, L., Galindo Reyes, M. A., Velásquez Valle, R., Sánchez Lucio, R., & Tafoya Rangel, F. (2014). Principales insectos plaga de los viñedos en el mundo, México y Aguascalientes.

González-Castro A, Alsasua A, Peñasco Y, Rodríguez JC, Duerto J. (2017). Tracheo-bronchitis and pneumonia associated with mechanical ventilation by *Chryseobacterium indologenes*. *Rev Esp Anesthesiol Reanim* 64: 294–298.

Grichko, V.P., and B. R. Glick. (2001). Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem*. 39: 11–17.

Habib, S. H., Kausar, H., and Saud, H. M. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in okra through ROS-scavenging enzymes. *BioMed research international*.

Hajek, A. E., and R. J. Leger. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39: 293–322.

Halbleib, C. M. and Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *J. Nutr.* 130: 1081-1084.

Hantsis-Zacharov, E., Shakéd, T., Senderovich, Y., Halpern, M. (2008) *Chryseobacterium oranimense* sp. nov., a psychrotolerant, proteolytic and lipolytic bacterium isolated from raw cow's milk. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2635–2639.

Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid and I. Ahmed. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60: 579–598.

Haydushka, I. A., Markova, N., Kirina, V., & Atanassova, M. (2012). Recurrent sepsis due to *Bacillus licheniformis*. *Journal of global infectious diseases*. 4(1): 82.

He, Z. L., W. Bian and J. Zhu. (2002). Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 647-663.

Herzog, P., Winkler, I., Wolking, D., Kämpfer, P., Lipski, A. (2008). *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nov., *Chryseobacterium gambrini* sp. nov., *Chryseobacterium pallidum* sp. nov. and *Chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 26–33.

Hol, W. G., W. de Boer and A. Medina. (2014). Beneficial interactions in the rhizosphere. In *Interactions in soil: promoting plant growth* (pp. 59-80). Springer, Dordrecht.

Holland, T, Bowen P, Bogdanoff C, Hart M (2013) How distinct are arbuscular mycorrhizal fungal communities associating with grapevines? *Biol Fertil Soils* 50: 667–674.

Hu, N., Zou, W., Cai, Q., Liu, Y., Chen, K., Li, M., and Zeng, L. (2018). The First Report of Cerebral Nocardiosis Caused by *Nocardia terpenica* Together With *Exiguobacterium profundum* Bacteremia. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(10).

Humber, R. A. (2016). Seeking stability for research and applied uses of entomopathogenic fungi as biological control agents. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(4): 1019-1025.

Inglis, D. G., M. S. Goettel, T. M. Butt and H. Strasser. (2001). Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI International, Wallingford, pp 23–69.

Isasti, G., Mora, L., García, V., Santos, J., & Palacios, R. (2009). Community-acquired bacteremia and acute cholecystitis due to *Enterobacter cloacae*: a case report. *Journal of medical case reports*, 3(1): 7417.

Jaber, L. R., and Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens?. *Biological control*. 116: 36-45.

Jambon, I., S. Thijs, N. Weyens and J. Vangronsveld. (2018). Harnessing plant-bacteria-fungi interactions to improve plant growth and degradation of organic pollutants. *J Plant Interact*. 13(1): 119-130.

James, R. R., J. S. Buckner, T. P. Freeman. (2003). Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84: 67-74.

Kamara, A. (2001). *Nutrición, Regulación del Crecimiento y Desarrollo Vegetal. Integración de Tecnológicos y Recomendaciones Agropecuarias de Kamara*. [online] http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort01/Ponencia_04.pdf.

Kämpfer, P., Chandel, K., Prasad, G. B. K.S., Shouche, Y. S., Veer, V. (2010). *Chryseobacterium culicis* sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2387–2391.

Karthiba, L., K. Saveetha, S. Suresh, T. Raguchander, D. Saravanakumar and R. Samiyappan. (2010). PGPR and entomopathogenic fungus bioformulation for the synchronous management of leaf folder pest and sheath blight disease of rice. Pest Manag Sci: formerly Pesticide Science. 66(5): 555-564.

Kasana, R. C., Yadav, S. K. (2007). Isolation of a psychrotrophic *Exiguobacterium* sp. SKPB5 (MTCC 7803) and characterization of its alkaline protease. Curr Microbiol. 54: 224–229.

Khachatourians, G. G., (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In The Mycota VI. Human and Animal Relationships, Howard/Miller eds., Springer-Verlag, Berlin. Pp 331-364.

Khalifa, A. Y., Alsyeeh, A. M., Almalki, M. A., and Saleh, F. A. (2016). Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. Saudi journal of biological sciences. 23(1): 79-86.

Khan, S., Nadir, S., Lihua, G., Xu, J., Holmes, K. A., and Dewen, Q. (2016). Identification and characterization of an insect toxin protein, Bb70p, from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, using *Galleria mellonella* as a model system. Journal of invertebrate pathology, 133: 87-94.

Kiewnick, S. (2006). Effect of temperature on growth, germination, germ-tube extension and survival of *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Biocontrol Sci Techn. 16(5): 535-546.

Kim, K., Jang, Y. J., Lee, S. M., Oh, B. T., Chae, J. C., & Lee, K. J. (2014). Alleviation of salt stress by *Enterobacter* sp. EJ01 in tomato and *Arabidopsis* is accompanied

by up-regulation of conserved salinity responsive factors in plants. *Molecules and cells*. 37(2): 109.

Kimouli, M., Vrioni, G., Papadopoulou, M., Koumaki, V., Petropoulou, D., Gounaris, A., and Tsakris, A. (2012). Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *Journal of medical microbiology*. 61(4): 596-599.

Kloepper JW. (1994). Plant growth promoting rhizobacteria (other system). En: *Azospirillum/Plant Association* (Y. Okon, Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 135–166.

Kloepper JW. (1996). Biological control agents vary in specificity for host, pathogen control, ecological habitat and environmental conditions. *Bio. Sci*. 46:406–409.

Kröber, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S. P., and Schlüter, A. (2014). Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Frontiers in microbiology*. 5: 252.

Kumar, G. P., N. Kishore, E. L. D. Amalraj, S. Ahmed, A. Rasul and S. Desai. (2012). Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regul*. 67:133–140.

La Jeon, Y., Yang, J. J., Kim, M. J., Lim, G., Cho, S. Y., Park, T. S., and Lee, H. J. (2012). Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation. *Journal of medical microbiology*, 61(12): 1766-1769.

Lacey, L. A., Fransen, J. J., and Carruthers, R. (1996). Global distribution of a naturally occurring fungi of Bemisia, their biologies and use as biological control agents. *Bemisia: 1995, taxonomy, biology, damage, control and management*.

Langley, J. M., Hanakowski, M., and LeBlanc, J. C. (2001). Unique epidemiology of nosocomial urinary tract infection in children. *American journal of infection control*, 29(2): 94-98.

Leão, A. C., Menezes, P. R., Oliveira, M. S., and Levin, A. S. (2016). *Acinetobacter* spp. are associated with a higher mortality in intensive care patients with bacteremia: a survival analysis. *BMC infectious diseases*. 16(1): 386.

Lee, J., Postmaster, A., Soon, H. P., Keast, D., and Carson, K. C. (2012). Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *Biometals*, 25(2): 285-296.

Leger, R. J. S., and Wang, C. (2010). Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4): 901-907.

Lemaitre, B., J. Hoffmann. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 25: 697–743.

Levitin, A., M. Whiteway. (2008). *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. *Cellular Microbiology* 10: 1021-1026.

Li, Z., Zhu, H. (2012) *Chryseobacterium vietnamense* sp. nov., isolated from forestsoil. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 62: 827–831.

Liao, X, O'Brien TR, Fang, W, St Leger, R. J. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98(16): 7089-255 96.

Liu, M., Liu, X., Cheng, B. S., Ma, X. L., Lyu, X. T., Zhao, X. F., and Fang, Y. L. (2016). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish journal of agricultural research*. 14(4): 26.

Lodesani, M., Costa, C., Franceschetti, S., Bergomi, P., Galaverna, G., & Dall'Asta, C. (2017). Toxicity of destruxins against the parasitic mite *Varroa destructor* and its host *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 56(3): 278-287.

Lugtenberg, B., and F. Kamilova. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541-556.

Mani, M., C. Shivaraju and N. S. Kulkarni. (2014). *The Grape Entomology*. Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London. ISBN 978-81-322-1616-2. DOI 10.1007/978-81-322-1617-9.

Marasco, R., E. Rolli, M. Fusi. (2013). Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *Biomed Res Int* 2013: 491091. doi:10.1155/2013/491091.

Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*. 4(1): 1-20.

McMurtry, J. A., Moraes, G. J. and Sourassou, N. F. (2013). Revision of the lifestyles of phytoseiid mites (Acari: Phytoseiidae) and implications for biological control strategies. *Systematic and Applied Acarology*, 18: 297–320. <http://dx.doi.org/10.11158/saa.18.4.1>.

Mehnaz, S., Weselowski, B., Aftab, F., Zahid, S., Lazarovits, G., and Iqbal, J. (2009). Isolation, characterization, and effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. *Canadian journal of microbiology*, 55(8), 1007-1011.

Meister, M., B. Lemaitre, J.A. Hoffmann, 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioassays* 19: 1019-1026.

Meyling, N. V., and J. Eilenberg, (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric Ecosyst Environ*. 113(1-4): 336-341.

Mezzatesta, M. L., Gona, F., and Stefani, S. (2012). Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 7: 887–902. doi: 10.2217/fmb.12.61.

Milner, R. J., P. R. Samson and G. K. Bullard, (2002). FI-1045: A profile of a commercially useful isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn.* 12(1): 43-58.

Monteen, M. R., Ponnappula, S., Wood, G. C., Croce, M. A., Swanson, J. M., Boucher, B. A., and Fabian, T. C. (2013). Treatment of *Chryseobacterium indologenes* ventilator-associated pneumonia in a critically ill trauma patient. *Annals of Pharmacotherapy*, 47(12): 1736-1739.

Monteiro, S. G., Bittencourt VREP, Daemon E, Faccini J. L. H. (1998). Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 7: 113–116.

Morgan, L. W., L. Boddy, S. J. Clark and N. Wilding. (1995). Influence of temperature on germination of primary and secondary conidia of *Erynia neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J Invertebr Pathol.* 65(2): 132-138.

Morrissey, J. P., J. M. Dow, G. L. Mark and F. O'Gara. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production?. *EMBO reports.* 5(10): 922-926.

Mukherjee, P., and Roy, P. (2016). Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Frontiers in microbiology.* 7: 967.

Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M., and Sessitsch, A. (2014). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and fertility of soils.* 50(2): 249-262.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The Journal of Biological Chemistry* 270. 45: 26723–26726.

Nemec, A., Krizova, L. Maixnerova, M. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*– *Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.* 162(4): 393-404.

Nourrisson, C., Dupont, D., Lavergne, R. A., Dorin, J., Forouzanfar, F., Denis, J., ... & Roux, S. (2017). Species of *Metarhizium anisopliae* complex implicated in human infections: retrospective sequencing study. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(12), 994-999.

Olbrich, P., Rivero-Garvía, M., Falcón-Neyra, M. D., Lepe, J. A., Cisneros, J. M., Marquez-Rivas, J., and Neth, O. (2014). *Chryseobacterium indologenes* central nervous system infection in infancy: an emergent pathogen?. *Infection*, 42(1): 179-183.

Olombrada, M., Medina, P., Budia, F., Gavilanes, J. G., Martínez-del-Pozo, Á., and García-Ortega, L. (2017). Characterization of a new toxin from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: the ribotoxin anisoplin. *Biological chemistry*, 398(1): 135-142.

Orduño-Cruz, N., A.W. Guzmán-Franco, E. Rodríguez-Leyva, R. Alatorre-Rosas, H. González-Hernández, G. Mora-Aguilera and J.C. Rodríguez-Maciel. (2015). In vitro selection of a fungal pathogen for use against *Diaphorina citri*. *Biocontrol*. 90: 6-15.

Ortíz-Catón, M., R. Alatorre-Rosas, R. Valdivia-Bernal, A. Ortiz-Catón, R. Medina-Torres and G. Alejo-Santiago. (2011). Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Bio Ciencias*. 1(2): 42-53.

Otieno, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., and Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*. 6: 745.

Padman, A. J., Henderson, J. Hodgson, S. (2014). Biomediated synthesis of silver nanoparticles using *Exiguobacterium mexicanum*. *Biotechnol Lett*. 36: 2079–2084.

Page, A. P., Roberts, M., Félix, M. A., Pickard, D., Page, A., and Weir, W. (2019). The golden death *bacillus Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. *BMC biology*. 17(1): 10.

Patten, C. L., Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 8:3795-3801

Pedrini, N., R. Crespo, M.P. Juárez. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 146:124-137.

Peleg, A. Y., Seifert, H. Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 21(3): 538-82.

Pinto, C., and Gomes, A. C. (2016). *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*, 61(3), 243-256. PMA. *Journal of hazardous materials*. 284: 261-268.

Pires, C., Carvalho, M. F., De Marco, P., Magan, N., Castro, P. M. L. (2010). *Chryseobacterium palustre* sp. nov. and *Chryseobacterium humi* sp. nov., isolated from industrially contaminated sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 60: 402–407.

Prittish, P., Rushabh, S., and Krunal, M. (2017). Isolation and characterization of plant growth promoting potential of *Acinetobacter* sp. RSC7 isolated from

Saccharum officinarum cultivar Co 671. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 5(4): 483-491.

Pucheta Díaz, M., A. Flores Macías, S. Rodríguez Navarro, M. de la Torre. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia 31: 856-860.

Qu, J., Xu, Y., Ai, G. M., Liu, Y., and Liu, Z. P. (2015). Novel Chryseobacterium sp. PYR2 degrades various organochlorine pesticides (OCPs) and achieves enhancing removal and complete degradation of DDT in highly contaminated soil. Journal of environmental management, 161: 350-357.

Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N., and Joshi, O. P. (2014). Plant growth-promoting traits in Enterobacter cloacae subsp. dissolvens MDSR9 isolated from soybean rhizosphere and its impact on growth and nutrition of soybean and wheat upon inoculation. Agricultural Research. 3(1): 53-66.

Rehner, S. A., and E. Buckley, (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. Mycologia. 97(1): 84-98.

Reineke, A., and Thiéry, D. (2016). Grapevine insect pests and their natural enemies in the age of global warming. Journal of Pest Science. 89(2): 313-328.

Richard, F. J., A. Aubert, C. M. Grozinger. (2008). Modulation of social Interaction s by immune stimulation in honey bee, Apis mellifera, workers. BMC Biology. 6:1-13.

Roberts, D. W., St Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenicfungi: mycological aspects. Adv. Appl. Microbiol. 54.

Rodrigues, D. F., Goris, J. Vishnivetskaya, T. (2006). Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost, description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. Extremophiles.;10: 285–294.

Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Macías-Rodríguez, L., and Santoyo, G. (2018). Pseudomonas

stutzeri E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 13: 46-52.

Rustiguel, C. B., Fernández-Bravo, M., Guimarães, L. H. S., and Quesada-Moraga, E. (2017). Different strategies to kill the host presented by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Canadian journal of microbiology*. 64(3): 191-200.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). (2014). Producción de uva.

Saleem, M., M. Arshad, S. Hussain and A. S. Bhatti. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34: 635–648.

Samish, M., Gindin, G. Alekseev, E. Glazer, I. (2001). Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol*. 87: 1355–1359. [PubMed: 11780821].

Sammaritano, J. A., Deymié, M., Herrera, M., Vazquez, F., Cuthbertson, A. G., López-Lastra, C., and Lechner, B. (2018). The entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* for the European grapevine moth, *Lobesia botrana* Den. & Schiff.(Lepidoptera: Tortricidae) and its effect to the phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 28(1): 83.

Samuels, R. I., I. C. Paterson. (1995). Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry Physiology*. 110: 661-669.

Sánchez, L. (2006). Metabolito bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* como agente biocontrolador en cultivos de interés agrícola. [On line]: <http://www.monografias.com/trabajos36/metabolitobacteriano/metabolito>.

Sánchez, M. B. (2015). Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology*. 6: 658.

Sánchez-Rodríguez, A. R., Raya-Díaz, S., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., del Campillo, M. C., & Quesada-Moraga, E. (2018). An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological control*. 116: 90-102.

Sandhu, S.S., S. E. Unkles, R. C. Rajak and J. R. Kinghorn. (2001). Generation of benomyl resistant *Beauveria bassiana* strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. *Biosci Tech*. 11: 245-250.

Santos, S., Neto, I. F., Machado, M. D., Soares, H. M., and Soares, E.V. (2014). Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. *Mol Biotechnol*. 172(1): 549-560.

Sawai, T., Yoshioka, S., Matsuo, N., Suyama, N., & Mukae, H. (2017). Intraabdominal abscess caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: A case report. *International journal of surgery case reports*, 41, 212-214.

Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., and Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical microbiology reviews*. 27(4): 927-948.

Seiedy, M., Tork, M., and Deyhim, F. (2015). Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) as a non-target organism. *Systematic and Applied Acarology*. 20(3): 241-251.

Selvakumar, G., Kundu, S., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, A. D., & Gupta, H. S. (2010). Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. *Indian journal of microbiology*. 50(1): 50-56.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2012). Ficha técnica: chapulín. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/124821/Ficha_tcnica.pdf.

SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2016). Producción de uva en Mexico.

Senthilraja, G., Anand, T., Durairaj, C., Kennedy, J. S., Suresh, S., Raguchander, T., and Samiyappan, R. (2010). A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leafminers and collar rot disease in groundnut. *Biocontrol Science and Technology*, 20(5): 449-464.

Shah, S., King, M., and Rose, L. (2018). Medical Management of Endocarditis Caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: A Case Report. *Journal of pharmacy practice*, 0897190018764957.

Shapiro-Ilan, D .I., Dutcher, J. D, Hatab, M. (2005). Recycling potential and fitness in steinernematid nematodes cultured in *Curculio caryae* and *Galleria mellonella* . *Journal of Nematology*. 37: 12–17.

Shi-qi An and Gabriele Berg. (2018). *Trends in Microbiology*, Month Year, Vol. xx, No. yy. Published by Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.006>.

Shivamurthy, V. M., Gantt, S., Reilly, C., Tilley, P., Guzman, J., & Tucker, L. (2016). *Bacillus pumilus* septic arthritis in a healthy child. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*.

SIFUPRO (Sistema de Información de Fundaciones Produce). (2013). Resultados de los análisis de perfiles aromáticos, polifenoles totales, acidez total y pH de muestras de vinos Chihuahuenses y de otras regiones de México.

Singh, N. K., Raichand, R. Kaur, I. (2013). *Exiguobacterium himgiriensis* sp. nov. a novel member of the genus *Exiguobacterium*, isolated from the Indian Himalayas. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 103: 789–796.

Singh, A. V., Prasad, B., and Goel, R. (2018). Plant growth promoting efficiency of phosphate solubilizing *Chryseobacterium* sp. PSR 10 with different doses of N and P fertilizers on Lentil (*Lens culinaris* var. PL-5) growth and yield. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(05): 2280-2289.

Singh, R. P., and Jha, P. N. (2017). The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1945.

Sivasakthi, S., Usharani, G., and Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African journal of agricultural research*. 9(16): 1265-1277.

Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P., and De Vos, P. (2010). Análisis de *Pseudomonas* fitopatógenas usando métodos inteligentes de aprendizaje: un enfoque general sobre taxonomía y análisis de ácidos grasos dentro del género *Pseudomonas*. *Revista mexicana de fitopatología*. 28(1): 1-16.

Strahan, B. L., Failor, K. C., Batties, A. M., Hayes, P. S., Cicconi, K. M., Mason, C. T., Newman, J. D. (2011). *Chryseobacterium piperi* sp. nov., isolated from a freshwater creek. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 61: 2162–2166.

Strahan, B. L., Failor, K. C., Batties, A. M., Hayes, P. S., Cicconi, K. M., Mason, C. T., Newman, J. D. (2011). *Chryseobacterium piperi* sp. nov., isolated from a freshwater creek. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 61: 2162–2166.

Susilowati, D. N., Sudiana, I., Mubarik, N. R., Agatis, J., and Campus, D. (2015). Species and functional diversity of rhizobacteria of rice plant in the coastal soils of Indonesia.

Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., and Morikawa, M. (2014). Plant growth-promoting bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* P23 increases the chlorophyll content of the monocot *Lemna minor* (duckweed) and the dicot *Lactuca sativa* (lettuce). *Journal of bioscience and bioengineering*. 118(1): 41-44.

Sylvia, D. M. (2005). *Principles and applications of soil microbiology*. Segunda Edición. Pearson/*Prentice Hall*. New Jersey, USA Págs. 259-306.

Tanada, Y., and H.K. Kaya, (1993). *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, USA, p. 666.

Tang, J., Zhang, Y., Cui, Y., and Ma, J. (2015). Effects of a rhizobacterium on the growth of and chromium remediation by *Lemna minor*. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(13): 9686-9693.

Tena, D., Martínez, N. M., Casanova, J., García, J. L., Román, E., Medina, M. J., and Sáez-Nieto, J. A. (2014). Possible *Exiguobacterium sibiricum* skin infection in human. *Emerging infectious diseases*, 20(12): 2178–2179. doi:10.3201/eid2012.140493.

Thungrabeab, M., and Tongma, S. (2007). Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insects. *Current applied science and technology*. 7(1-1): 8-12.

van Loon, L.C., Bakker, P. Pieterse, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.

Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol*. 103: 753–765.

Vandamme, P., Bernardet, J.-F., Segers, P., Kersters, K., and Holmes, B. (1994). New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of

Chryseobacterium gen. nov., Bergeyella gen. nov., and Empedobacter nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 827–831. doi:10.1099/00207713-44-4-827.

Veer, S. A., and Goel, R. (2015). Plant growth promoting efficiency of Chryseobacterium sp. PSR 10 on finger millet (*Eleusine coracana*). Journal of Global Biosciences. 4(6): 2569-2575.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., and Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. Molecules. 21(5): 573.

Venkadesaperumal, G., Amaresan, N., and Kumar, K. (2014). Plant growth promoting capability and genetic diversity of bacteria isolated from mud volcano and lime cave of Andaman and Nicobar Islands. Brazilian Journal of Microbiology. 45(4): 1271-1281.

Vijayalaxmi, S., Appaiah, K. A., Jayalakshmi, S. K., Mulimani, V. H., and Sreeramulu, K. (2013). Production of bioethanol from fermented sugars of sugarcane bagasse produced by lignocellulolytic enzymes of *Exiguobacterium* sp. VSG-1. Applied biochemistry and biotechnology. 171(1): 246-260.

Vishnivetskaya, T. A., Kathariou, S., Tiedje, J. M. (2009) The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. Extremophiles. 13: 541–555.

Walsh, U. F., Morrissey, J. P. O'Gara. F. (2001). *Pseudomonas* for Biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. Curr. Opinions. Biotechnol. 12:289-295. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00212-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00212-3).

Wang, C., Fan, M. Li, Z. Butt, T. M. (2004). Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. Journal of Applied Microbiology. 96: 861870.

Wang, C., R.J. St. Leger. (2007). The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachments to plants. *Eukaryotic Cell*. 6: 808-816.

Yassin, A.F., Hupfer, H., Siering, C., Busse, H.-J. (2010) *Chryseobacterium treverense* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1993–1998.

Yeo, H., J. K. Pell, P. G. Alderson, S. J. Clark and B.J. Pye. (2003). Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag Sci: formerly Pesticide Science*. 59(2): 156-165.

Yousaf, S., Bulgari, D. Bergna, A. Pancher, M. Quaglino, F. Casati, P. Campisano, A. (2014). Pyrosequencing detects human and animal pathogenic taxa in the grapevine endosphere. *Front Microbiol.* 5:1–9.

Zahir, A. Z., Arshad, M. Frankenberg, W. T. (2004). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agricultura. *Advances in Agronomy*. 81: 97-108.

Zamora, L., Vela, A. I., Palacios, M. A. Sánchez-Porro, C. Svensson-Stadler, L. A., Domínguez, L. Moore, E. R. B., Ventosa, A. Fernández-Garayzábal, J. F. (2012). *Chryseobacterium viscerum* sp. nov., isolated from diseased fish. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 2934–2940.

Zandi, P., and Basu, S. K. (2016). Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizers in Stabilizing Agricultural Ecosystems. In *Organic Farming for Sustainable Agriculture* (pp. 71-87). Springer International Publishing.

Zarraonaindia, I, Gilbert, J. (2014). Probing the microbial mysteries of wine. *Microbe* 9: 442–447.

Zhioua, E. H., M. Browning, P. W. Johnson, H. S. Ginsberg, R. A. and LeBrun. (1997). Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Parasitol* .83:815–818. [PubMed: 9379283].

Zhu, T. F., Chen, F. F., and Li, J. C. (2017). A strain of pathogenic *Bacillus subtilis* results in brain damage in ducklings when co-infected with *Riemerella anatipestifer*. *Polish journal of veterinary sciences*.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*. 17(6): 553-596.

Zimmermann, G. (1993). The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and Its Potential as a Biocontrol Agent, *Pesticide Science*. 37: 375-379.

CAPÍTULO II: Molecular identification of genera *Metarhizium* (Hypocreales: Clavicipitaceae) and *Beauveria* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and their *in vitro* development at different temperatures

Ordoñez-Beltrán Veronica¹, Orduño-Cruz Nuvia^{1*}, Acosta-Muñiz Carlos Horacio.², Rios-Velasco, Claudio², Pallares-Solano Luis Alberto², Pérez-Leal Ramona¹ and Jacobo-Cuellar Juan Luis.¹

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Av. Pascual Orozco s/n, Campus 1, Santo Niño, Chihuahua, Chih., México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México

*For correspondence: norduno@hotmail.com

Abstract

The entomopathogenic fungi are commonly found in the soil, therefore the identification and characterization of native populations, provides information that allows a better understanding of their behavior, persistence and virulence in the field. Four isolates of *Beauveria pseudobassiana* and six of *Metarhizium anisopliae* were isolated of the rhizosphere of grapevine plants (*Vitis vinifera* L). The molecular identification of the species was made from the internal transcribed space (ITS) of the 18S rDNA. The temperature is one of the main environmental factors that affects the development of entomopathogenic fungi, therefore the objective of this study was to evaluate

germination, growth and sporulation at three temperatures 15, 25 and 35 °C, and two times, as well the virulence against *T. molitor* larvae of the selected isolates. The results showed that the species is related to radial growth and germination, but not to sporulation. At 35°C, the isolates, germinated, grew and sporulated less than at other temperatures, mostly those of *B. pseudobassiana*. The isolates of *M. anisopliae* reached a higher radial growth at all three temperatures. The isolates of *B. pseudobassiana* obtained a higher germination at 15 and 25 °C. In sporulation the results were not clear regarding the behavior of the species at 15 and 25 °C; however, at a temperature of 35 °C, better behavior was obtained in *M. anisopliae*. The results of this research contribute to a better understanding of the ecology of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria pseudobassiana* in the agroecosystem of the grapevine plant.

Key words: Entomopathogenic fungi; rhizosphere *Vitis vinifera*; isolates; virulence

Introduction

Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* are widely distributed in nature (Meyling and Eilenberg, 2006; Meyling et al., 2009; Ormond et al., 2010), and used as biological control agents (Meyling and Eilenberg, 2006; Meyling et al., 2009; Ormond et al., 2010), as an alternative to synthetic insecticides (Khandagle et al., 2011). In recent years, its use has increased due to its high pathogenicity detected in some isolates, and due to biological attributes like short term growth, sporulation and germination.

Among many factors that can influence the entomopathogenic fungi characteristics, one is the place of origin, which is related with the intraspecific variability (Rehener and Buckley, 2005). On the other hand, environmental conditions as humidity, solar radiation and temperature, affect the propagation, dispersion and persistence of the entomopathogenic fungi (Tanada and Kaya, 1993; Inglis et al., 2001). Being the temperature the most determinant factor over growth, germination and sporulation (Ortíz-Catón et al., 2011). Several studies have determined that the optimum temperature range from 25 to 30 °C, which enhance the infection start, incubation time and the viability of these microorganisms (Kiewnick, 2006; Bugeme et al., 2008; Orduño-Cruz et al., 2015). Optimum temperature is linked to a greater and faster development, germination and sporulation. A fast and abundant sporulation is essential for a quick establishment in field, and is also related to a higher number of infections and epizootics (Ortíz-Catón et al., 2011). Besides, short time germination may be associated to a greater virulence and pathogenicity (Morgan et al., 1995; Altre et al., 1999).

A better understanding of the indigenous entomopathogenic fungi ecology and composition is required, which should be consider when developing the material as biological control agent (Bojórquez et al., 2010). Due to this, the selection of indigenous isolates that are well adapted, especially to temperature, would facilitate the selection of the best isolates with potential in pest management (Yeo et al., 2003; Meyling and Eilenberg, 2006; Chandra and Rahman, 2016). Therefore, it is essential to match the

thermal tolerance of a microbial control agent to the expected climatic conditions in the target environment (Ouedraogo et al., 1997).

Based on its exudates, plants can modulate the microorganisms that are associated with it (Cook et al., 1995), therefore, the microorganism-plant associations will be highly specific for each species. In Mexico, no studies have been reported to have characterized and isolated entomopathogenic fungi from the rhizosphere of grapevine (*Vitis vinifera*), to this date. It is worth mentioning that the grapevine is an alternative cultivar with a great potential in northern Mexico owing to its outstanding adaptability to drought conditions, low fertility soils, as well as its potential to produce high quality wines (García, 2017).

Hence, we isolated and identified entomopathogenic fungi (*Beauveria pseudobassiana* and *Metarhizium anisopliae*) indigenous from Chihuahua, Mexico obtained from grapevine rhizosphere, and we evaluated the relationship between the phylogenetic placement of the species with their pathogenicity and development characteristics at different temperatures *in vitro*.

Materials and methods

Isolation and purification

The isolates were obtained from grapevine rhizosphere soil samples, at four locations of Chihuahua, Mexico (Table 1).

For entomopathogenic fungi isolation, *Tenebrio molitor* larvae were used with the insect trap technique (Zimmermann, 1986; Estrada-Virgen et al., 2014). The insects with soil were placed at 25°C for 15 days (Barillot et al., 2013) and monitored every 24 hours to

collect the larvae showing mycosis. The mycosed larvae were individually disinfected to assure the isolation of the inner fungi only (Goettlel and Inglis, 1997). Sections of micosed larvae were individually placed in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar (ADS: Bioxon, Becton Dickinson de México, SA de CV, Cuautitlan Izcalli, State of Mexico, Mexico) and incubated at 25 °C in complete darkness for 8 days. For the purification of isolates a monosporic culture was performed (Tanada and Kaya, 1993) and purified isolates were preserved in glycerol at -80 °C.

Molecular identification

Genomic DNA extraction was performed from 7 days old fungi mycelium of ten isolates, according to the methodology described by Bustillos-Rodríguez et al., (2016). The DNA obtained was examined by electrophoresis in agarose gel using universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') to amplify the internal transcribed spacer (ITS) of the 18S rDNA (White et al., 1990). The amplification conditions were as follows: DNA denaturation at 94 °C for 5 min, 30 cycles were used at 94 °C for 30 s, alignment at 60 °C for 30 s, extension at 72 °C for 45 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. The products obtained were sequenced by Macrogen Company (Rockville, MD). The BLAST algorithm was used to compare the sequences with the NCBI database (Altschul et al., 1990). Successively, a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining tree method using the software Mega 7 version 7.0.26 and were aligned using Muscle tool.

Inoculum

The spore concentration of each isolate was determined from 15 d old cultures with a Neubauer chamber (Paul Marienfeld GmbH & Co, Germany). Prior to this, the spore suspension was filtered through a sterile cloth to remove the mycelium from the fungi. This information is mentioned in each of the following tests.

Effect of temperature on radial growth

To measure the effect of temperature over radial growth, a methodology from Orduño et al., (2015) with modifications was used. Petri dishes with the ADS medium were inoculated with 150 μ l of a suspension of 1×10^7 conidia/ml and incubated at 25 °C for 72 h. Mycelium circles of 9 mm diameter were obtained, and were deposited inverted in the center of the Petri dishes with ADS. The plates were incubated at 15, 25 and 35 °C, and the area of each colony was systematically measured every 24 h for 15 d. The area (cm^2) of the colony was estimated based on the area occupied by the fungus from images taken in an Epson light scanner, and processed with the ImageJ program (Orduño et al., 2015).

Effect of temperature on germination

A suspension of 1×10^5 conidia/ml was used, placed over a microscope slide with a thin layer of ADS (≈ 1 mm), three aliquots of 10 μ l were placed according to the methodology described by Nishi et al., (2013). At the end of each period, a drop of lactophenol blue solution was added to each aliquot of the slide to stop germination and, with the aid of an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), 100 spores of a randomly selected

optical field were counted, so they were registered germinated and not germinated. We considered viable germinated spores when the germ tube exceeded half the length of these (Orduño et al., 2015).

Effect of temperature on sporulation

A spore suspension of 1×10^7 conidia/ml was used. From each isolate, 300 μ l were deposited in Petri dishes with ADS and were uniformly distributed (Nishi et al., 2013), and finally incubated for 15 d at three temperatures (15, 25 and 35 °C, Chandra and Rahman, 2016). Disks (8 mm diameter) were cut randomly from the Petri dishes and placed in 50 ml tubes containing 5 ml of sterile distilled water with 0.03% Tween 80. The suspension was shake for 2 min to detach and quantify the conidia with a Neubauer chamber.

Pathogenicity of *B. pseudobassiana* and *M. anisopliae* against larvae of *Tenebrio molitor*

The isolates (B21, C3, C4, C7, S17 and S30) which obtained a better outcome in terms of germination, growth and sporulation on the different temperatures were selected. *Tenebrio molitor* larvae from ten to eleven instar were used for this evaluation. A suspension of 1×10^8 conidia/ml was used for each isolate. Larvae were immerse in the suspension for 10 seconds. A sterile filter was placed in each Petri dish and 15 larvae were placed over it. Petri dishes were kept under control conditions ($28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% r.h. and 16:8 light regime). Mortality was recorded every 48 hours in a 10 day period. A

control treatment where the larvae were immersed in sterile distilled water with Tween 80 at 0.003% was used (Orduño-Cruz et al., 2011, with modifications).

Statistical analysis

The radial growth, sporulation and germination data were analyzed by a completely random factorial design. Three replicates were used per treatments and the complete experiment was repeated on two different occasions (six replicates in total). For the evaluation of pathogenicity, it was used a completely randomized design with three replicates per treatments. The separation of means was performed by the Tukey test ($P \leq 0.05$), using the SAS^{MR} software (Statistic Analysis System, version 9.0).

Results

Molecular identification

Six isolates were identified as *M. anisopliae* (Metchnikoff 1879, Sorokin 1883) and four as *B. pseudobassiana* (S.A. Rehner & Humber) according to the homology with those of the NCBI database. The source and place of origin of the isolates are shown in Table 1. The access numbers of the sequence of the ten isolates deposited in GenBank are shown the phylogenetic tree (Figure 3). Isolates with a greater phylogenetic distance were C7 (*M. anisopliae*) and C21 (*B. pseudobassiana*), both collected from the vineyard of Cuauhtémoc.

Effect of temperature on radial growth

The radial growth of the isolates showed significant differences between temperatures ($F = 2,299.98$, $p < 0.0001$), isolates ($F = 31.21$, $p < 0.0001$) and interaction between temperatures and isolates ($F = 14.72$, $p < 0.0001$). The comparison analysis of the treatments for each temperature showed a significant difference in all combinations, 15 °C ($F = 9.09$, $p < 0.0001$), 25 °C ($F = 20.28$, $p < 0.0001$) and 35 °C ($F = 17.52$); $p < 0.0001$). The isolate that showed the greatest radial growth rate was B21 (3.13 cm²/day) at 25 °C, while the isolate C3 presented the lowest rate (0.005 cm²/day, Figures 4-6).

Effect of temperature on germination

There were differences between temperatures ($F = 321.94$, $p < 0.0001$), isolates ($F = 44.18$, $p < 0.0001$) and interaction between temperatures and isolates ($F = 12.17$, $p < 0.0001$). The isolate C4 present full germination (100%) at temperature of 25 °C, while germination on isolates S17, S22, S30 and B2, was null at 25 °C (Figures 7-9).

Effect of temperature on sporulation

In the sporulation, there were significant differences between the temperatures ($F = 5.67$, $p = 0.0043$), the isolates ($F = 2.82$, $p = 0.0010$) and in the interaction between these factors ($F = 2.82$, $p = 0.0010$). The optimal sporulation temperature was 25 °C, however, between 15 and 35 °C there was no significant difference. The isolate that showed the greatest sporulation was S17 at 25 °C (3.7×10^9 conidia/ml). Though, in

the isolate S30, at 15 °C, the sporulation was zero. Equally, the isolates C3, C4, C5, C21 and S22 the sporulation was null at 35 °C (Figures 10-12).

Pathogenicity of *B. pseudobassiana* and *M. anisopliae* against larvae of *Tenebrio molitor*

There were no significant differences between the mortality of the larvae caused by the selected isolates ($F = 0.66$, $p = 0.6861$). The highest mortality was reached by the isolate S30 (29%) of *M. anisopliae*, while the lowest was obtained by the isolate C4 (9%) of *B. pseudobassiana* (Figure 13). There was no mortality in the control treatment.

Discussion

Previous reports have documented the molecular identification of species of *Metarhizium* (Fernandes et al., 2010, Nishi et al., 2013), in which they have evaluated the effect of temperature over their development. Nevertheless, this is the first report of isolation of *B. pseudobassiana* and *M. anisopliae* from the rhizosphere of *V. vinifera* in northern Mexico.

It has been documented that the capacity of the entomopathogens to adapt and survive to a broad range of temperatures is a key factor for their success in the field (Maniania et al., 2008). The growth of the fungi, like *B. bassiana* and *M. anisopliae* depends strongly on temperature (Fargues et al., 1992; Vestergaard et al., 1995). At 25°C all of the isolates showed a greater radial growth, although this was greater for most of the *M. anisopliae* isolates, compared to the *B. pseudobassiana* ones. However, at 15 y 35°C a significant decrease was observed, especially at the last one. Some studies

have determined that optimum temperature for *M. anisopliae* y *B. Bassiana* is 25 °C (Glare and Milner 1991; Ekesi et al., 1999; Ouedraogo et al., 1997; Milner et al., 2002; Dimbi, 2004; Bugeme et al., 2008). However, results can vary between 20-30 °C, depending on agroclimatic factors of the place of origin of the fungi, as well as their genetic conditions. The reduction of radial growth in these genus at 15 °C coincide with Tefera and Pringle (2003) and Yeo et al., (2003) findings. Nonetheless, in this study, *M. anisopliae* isolates appeared to be less affected than *B. pseudobassiana* isolates, which can be due that *M. anisopliae* isolates to adapt quickly to cold conditions (Glare and Milner, 1991). At 35 °C the radial growth of all the isolates was lower compared to those of 15 and 25 °C. This may be due to that temperature range of 30-35 °C is above the optimum for the growth of *B. bassiana* and *M. anisopliae* (Greaves, 1964; Li, 1984; Milner et al., 1998).

The results of this study show that incubation at 25 °C favored the germination in all isolates. This coincides with that reported by some studies where the optimum temperature for germination of *M. anisopliae* and *B. bassiana* isolates occurred between 25-30 °C (Glare and Milner, 1991; Ekesi et al., 1999; Tefera and Pringle 2003; Dimbi et al., 2004; Kiewnick, 2006; Bugeme et al., 2008, Orduño et al., 2015). At 15 °C the germination rate was reduced significantly, specially in of *M. anisopliae*, which in some isolates, germination was near to zero. These results coincide with Yeo et al., (2003) who found that low temperatures caused a greater reduction of germination in isolates of the genus *Metarhizium* than in *Beauveria*. As well as in radial growth, incubation at 35 °C provoked the greatest reduction in germination, particularly in *B.*

pseudobassiana being almost zero the percentage of germination (0.03-0.34%); this is according with other studies (Orduño et al., 2015; Bugeme et al., 2008). This may be due to the fact that strains of *M. anisopliae* generally have a higher temperature profile for germination than *B. bassiana* (Inglis et al., 1997; Milner, 1997).

In the sporulation parameter, there was great variability among the isolates, not making clear which species behaves better. At temperature of 25 °C sporulation reached its highest peak, coinciding with other studies where the optimum range was 20-30 °C (Ekesi et al., 1999; Tefera and Pringle 2003; Dimbi et al., 2004; Kiewnick, 2006). This is important because a rapid and highest sporulation is related to a greater epizootic events in field (Sun et al., 2003). Both at 15°C as 35°C temperatures, a reduction in sporulation was observed, especially in *B. pseudobassiana* isolates, which coincides with the results of Orduño et al., (2015) and Ortíz-Catón et al., (2011), demonstrating that this genus is more sensitive to high temperatures.

Regarding to pathogenicity of the selected isolates there was no difference when comparing *M. anisopliae* and *B. pseudobassiana*. Although the selected isolates obtained different results in terms of germination, growth and sporulation, the fact that they have not presented significant differences in pathogenicity coincides with some studies in which it has been determined that there is no direct relationship between these variables (Inglis et al., 1997; Tefera and Pringle., 2003; Bugeme et al., 2008), and differs from others where relationship between these variables has been found (Morgan et al., 1995; Altre et al., 1999).

In conclusion, the results of this study provide evidence to assume that the species is related to radial growth and germination; however, this did not occur with sporulation. In general, all isolates were affected by temperatures, being 25 °C the one that produced the greatest positive effect. Furthermore, *M. anisopliae* isolates showed a general better outcome compared to *B. pseudobassiana* ones. It is advisable to isolate and identify more indigenous EF species, especially from plants rhizosphere from which microbiome has never been studied. This would allow to select the most promising organisms in the management of pests. It would also be interesting to determine the different expressed or repressed genes by subjecting EF to different temperatures.

References

Altre, J.A., J.D. Vandenberg and F.A. Cantone, 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to Diamondback Moth, *Plutella xylostella*: Correlation with Spore Size, Germination Speed, and Attachment to Cuticle. *J Invertebr Pathol*; 73(3): 332-338.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D. J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*; 215(3): 403-410.

Barillot, C. D., C.O. Sarde, V. Bert, E. Tarnaud and N. Cochet, 2013. A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Ann Microbiol*; 63(2): 471-476.

Bojórquez, A. D. A., C.G. Gutiérrez, J.R.C. Báez, M.Á.A, Sánchez, L.G. Montoya and E.N. Pérez, 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. Ra Ximhai: *Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*; 6(1): 51-56.

Bugeme, D. M., N. K. Maniania, M. Knapp and H.I. Boga, 2008. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. In *Diseases of Mites and Ticks*, pp. 275-285. Springer, Dordrecht.

Bustillos-Rodríguez, J. C., C. Rios-Velasco, R. Valdéz-Licano, D.I. Berlanga-Reyes, J. J. Ornelas-Paz, C.H. Acosta-Muñiz and O.J. Cambero-Campos, 2016. Laboratory Assessment of *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. Isolates to Control *Brachystola magna* in Northern México. *Southwest Entomol*; 41(3): 643-656.

Chandra Teja, K. N. P. and S. J. Rahman, 2016. Characterisation and evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin strains for their temperature tolerance. *Mycology*. 7(4), 171-179.

Cook, R.J., L.S. Thomashow, D.M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Banger and D.S. Kim, 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 4197.

Dimbi, S., N. K. Maniania, S.A. Lux and J.M. Mueke, 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*; 49(1): 83-94.

Ekesi, S., N.K. Maniania and K. Ampong-Nyarko, 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Sci Techn*; 9(2): 177-185.

Estrada-Virgen, O., J.C. Cambero, N. Ávila, C.V. Ríos, C.R.C. Carvajal and A. B. Robles, 2014. Diversidad de hongos entomopatógenos aislados de suelo de Agroecosistemas de maíz en el estado de Nayarit. *Entomología Mexicana*; 1:246–250.

Fargues, J., N.K. Maniania, J.C. Delmas and N. Smits, 1992. Influence de la température sur la croissance *in vitro* d'hyphomycètes entomopathogènes. *Agronomie*; 12(7): 557-564.

Fernandes, É. K., C.A. Keyser, J.P. Chong, D.E. Rangel, M.P. Miller and D.W. Roberts, 2010. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *J Appl Microbiol*; 108(1): 115-128.

García, A., 2017. Chihuahua, ¿tierra de vinos? (II). México: *El Economista*; <https://www.economista.com.mx/opinion/Chihuahua-tierra-de-vinos-II-20170914-0044.html>.

Glare, T. R. and R.J. Milner, 1991. Ecology of entomopathogenic fungi, in Handbook of Applied Mycology. Humans, Animals and Insects (AJELLO, D. K. & MUKERJI, K. G., Eds.), vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 547-572.

Greves, T., 1964. Temperature studies of termite colonies in living trees. *Aust J Zool*; 12(2): 250-262.

P

Inglis, G. D., D.L. Johnson and M.S. Goettel, 1997. Effects of temperature and thermoregulation on mycosis by *Beauveria bassiana* in grasshoppers. *BioControl*; 7: 131–139.

Khandagle, A. J., V.S. Tare, K.D. Raut and R.A. Morey, 2011. Bioactivity of essential oils of *Zingiber officinalis* and *Achyranthes aspera* against mosquitoes. *Parasitol Res*; 109(2): 339-343.

Kiewnick, S., 2006. Effect of temperature on growth, germination, germ-tube extension and survival of *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biocontrol Sci Techn*; 16(5): 535-546.

Li, Y.H., 1984. The nest temperatures of Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Entomol. Knowledge* 21. 170–172 (in Chinese).

Maniania, N. K., D.M. Bugeme, V.W. Wekesa, I. Delalibera and M. Knapp, 2008. Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), pests of horticultural crops. In *Diseases of Mites and Ticks* (pp. 259-274). Springer, Dordrecht.

Meyling, N. V., and J. Eilenberg, 2006. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agric Ecosyst Environ*; 113(1-4): 336-341.

Meyling, N. V., M. Lübeck, E.P. Buckley, J. Eilenberg and S.A. Rehner, 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal

entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. *Mol. Ecol*; 18(6): 1282-1293.

Milner, R. J., 1997. Insect pathogens: How effective are they against soil insect pests. In *Proceedings of the 3rd Brisbane workshop on soil invertebrates* (Vol. 63, p. 67).

Milner, R. J., P.R. Samson and G.K. Bullard, 2002. FI-1045: A profile of a commercially useful isolate of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn*; 12(1): 43-58.

Milner, R. J., J.A. Staples and G.G. Lutton, 1998. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *BioControl*;1(3): 240-247.

Morgan, L. W., L. Boddy, S.J. Clark and N. Wilding, 1995. Influence of temperature on germination of primary and secondary conidia of *Erynia neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). *J Invertebr Pathol*; 65(2): 132-138.

Nishi, O., K. Iiyama, C. Yasunaga-Aoki and S. Shimizu, 2013. Comparison of the germination rates of *Metarhizium* spp. conidia from Japan at high and low temperatures. *Lett Appl Microbiol*; 57(6): 554-560.

Orduño-Cruz, N., A.W. Guzmán-Franco, E. Rodríguez-Leyva, R. Alatorre-Rosas, H. González-Hernández, G. Mora-Aguilera and J.C. Rodríguez-Maciel, 2015. *In vitro* selection of a fungal pathogen for use against *Diaphorina citri*. *Biocontrol*; 90: 6-15.

Orduño-Cruz, N., A.W. Guzmán-Franco, E. Rodríguez-Leyva, J. López-Collado, J.M, Valdéz-Carrasco and G. Mora-Aguilera, 2011. Susceptibility of the cactus weevil *Metamasius spinolae* to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* under laboratory and field conditions. *Journal of applied microbiology*; 111(4): 939-948.

Ormond, E. L., A.P. Thomas, P.J. Pugh, J.K. Pell and H.E. Roy, 2010. A fungal pathogen in time and space: the population dynamics of *Beauveria bassiana* in a conifer forest. *FEMS Microbiol Ecol*; 74(1): 146-154.

Ortíz-Catón, M., R. Alatorre-Rosas, R. Valdivia-Bernal, A. Ortiz-Catón, R. Medina-Torres and G. Alejo-Santiago, 2011. Efecto de la temperatura y humedad relativa sobre el desarrollo de los hongos entomopatógenos. *Bio Ciencias*; 1(2): 42-53.

Ouedraogo, A., J. Fargues, M.S. Goettel and C.J. Lomer, 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*; 137(1): 37-43.

Rehner, S. A., and E. Buckley, 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*; 97(1): 84-98.

SAS^{MR} Institute Inc. statistical analysis software, versión 9.0.

Tanada, Y., and H.K. Kaya, 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, USA, p. 666.

Tefera, T., and K. Pringle, 2003. Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. *Biocontrol Sci Techn*; 13(7): 699-704

Vestergaard, S., A.T. Gillespie, T. M. Butt, G. Schreiter and J. Eilenberg, 1995. Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Sci Techn*; 5(2): 185-192.

White, T. J., T. Bruns, S.J.W.T Lee and J.L. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*; 18(1): 315-322.

Yeo, H., J.K. Pell, P.G. Alderson, S.J. Clark and B.J. Pye, 2003. Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag Sci: formerly Pesticide Science*; 59(2): 156-165.

Zimmermann, G., 1986. The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J Appl Entomol*; 102(1-5): 213-215.

Tables

Table 1. Isolates used in the study.

Species	Isolate	Host	Geographical origin
<i>M. anisopliae</i>	B2	Soil	Bustillos, Chih., México (28.47 ⁰ N, 106.66 ⁰ O, 2060 msnm)
	B21		
	C7		
	S17		Namiquipa, Chih., México (28.95 ⁰ N, 107.54 ⁰ O, 1916 msnm)

S22

S30

B. pseudobassiana C3

Cuahtémoc, Chih., México (28.41°N, 106.88°O, 2048 msnm)

C4

C5

C21

Figures

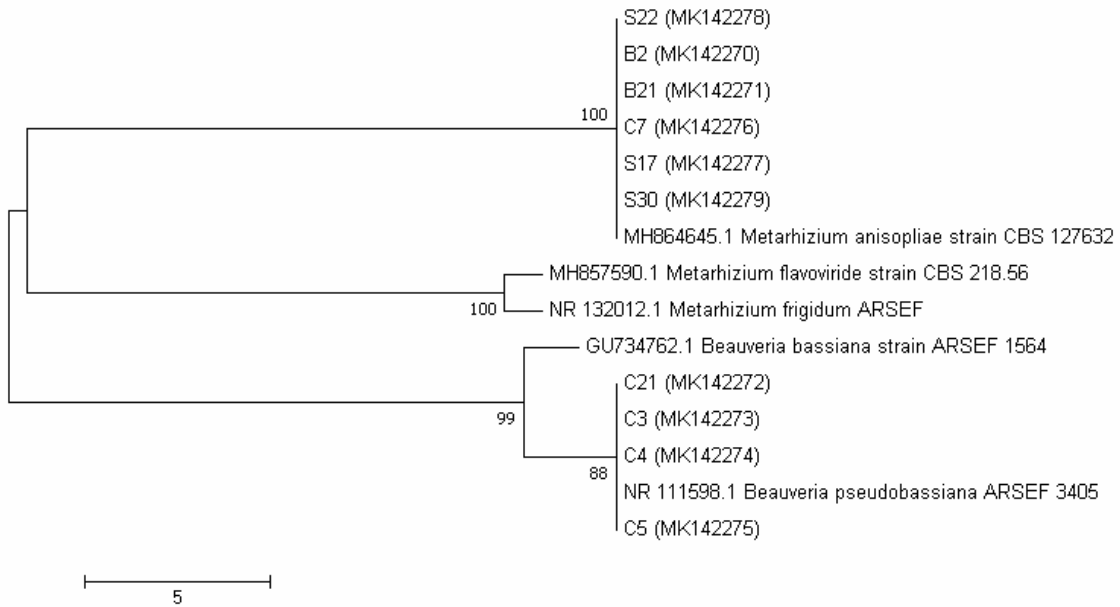


Figure 3. Entomopathogenic fungus dendrogram constructed with the sequences of the ITS 18S rDNA region, based on the Neighbor-Joining method. The access numbers of each of the isolated bacteria are shown.

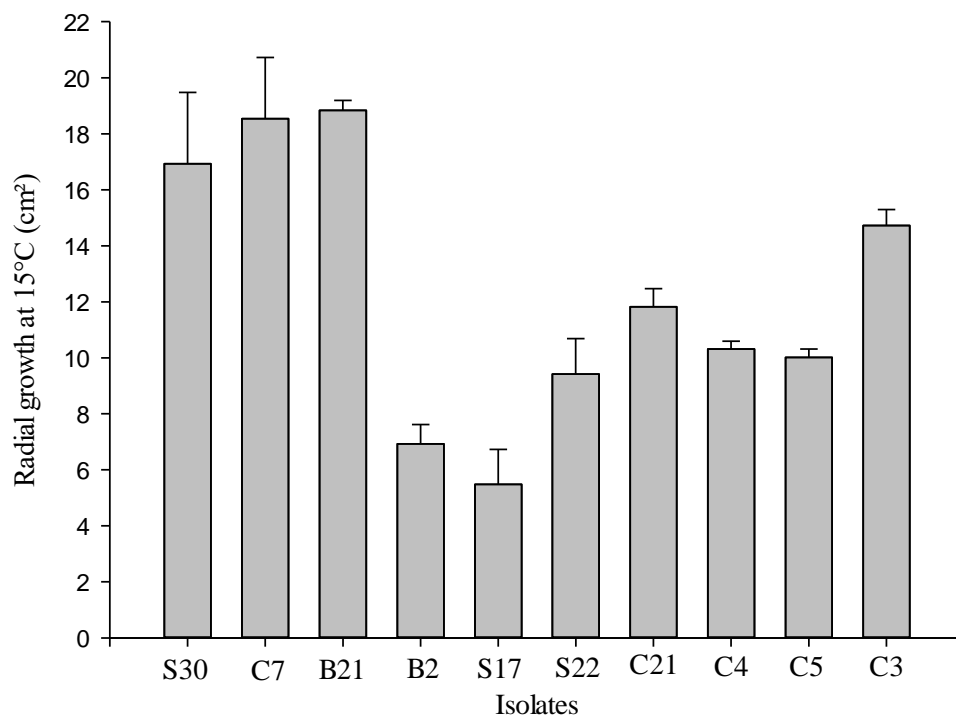


Figure 4. Radial growth of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 15°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

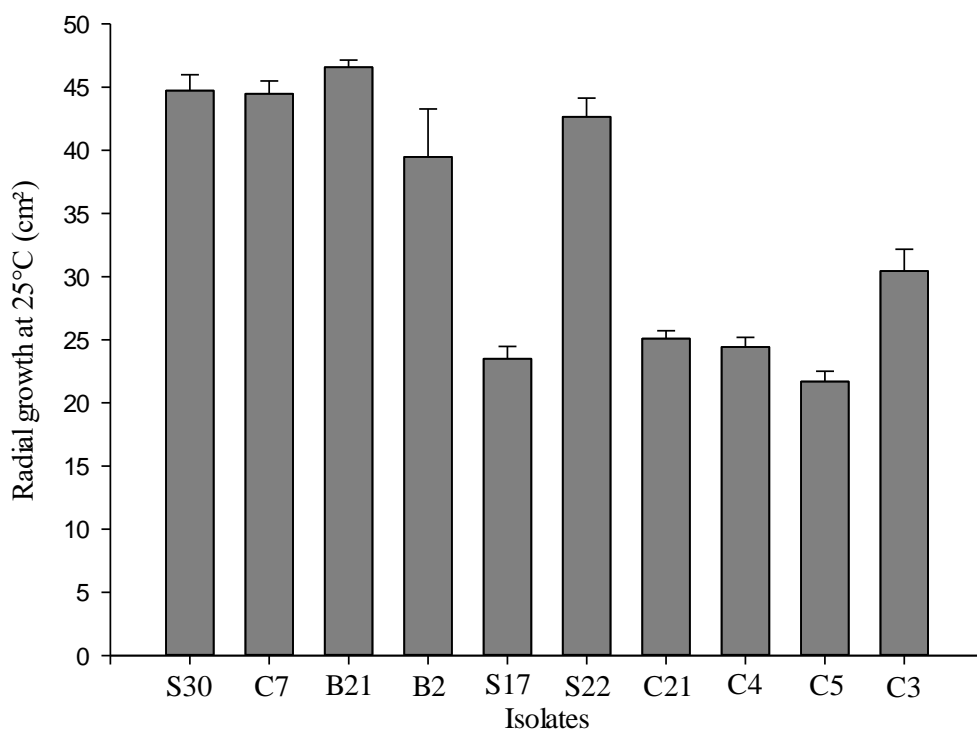


Figure 5. Radial growth of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 25°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

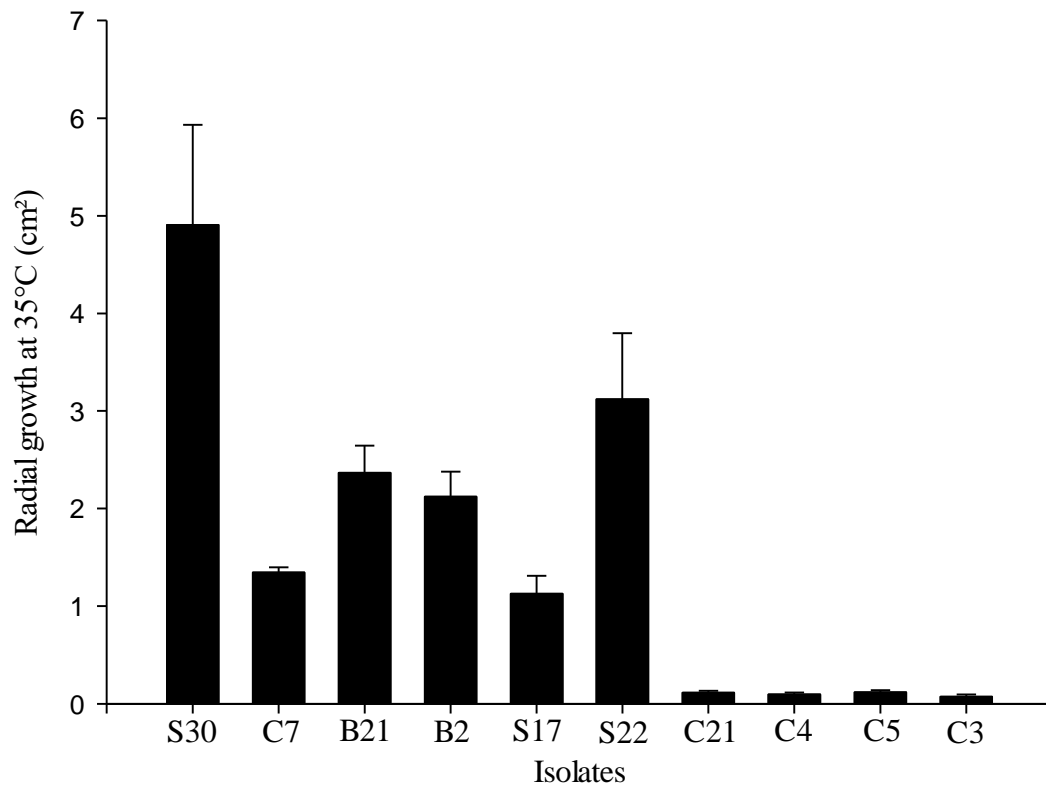


Figure 6. Radial growth of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 35°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

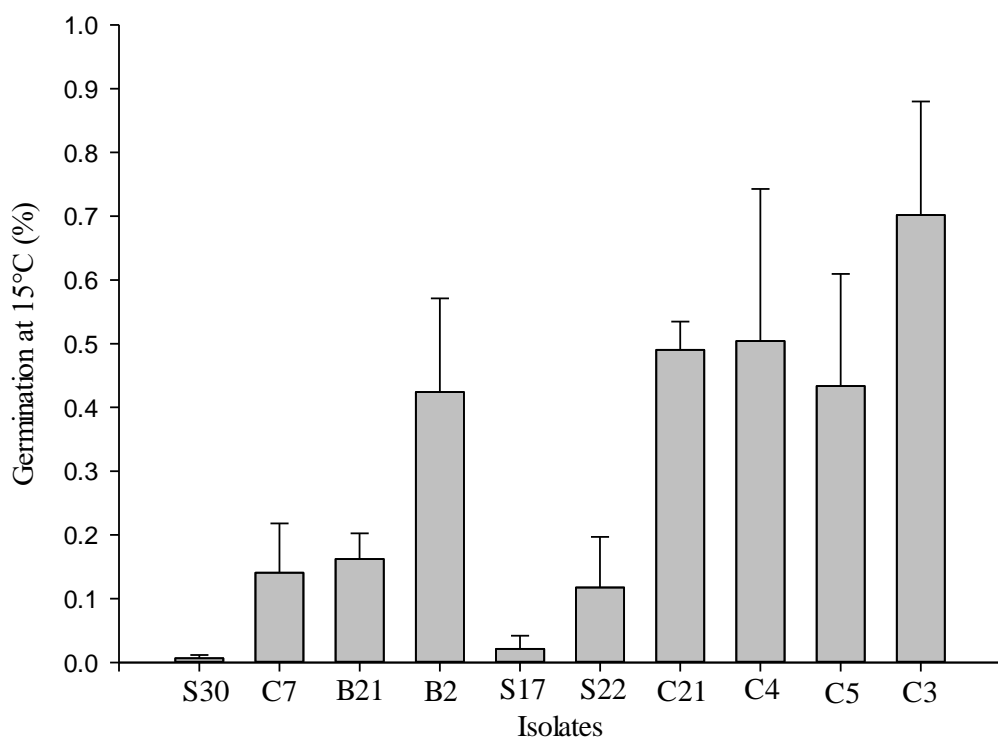


Figure 7. Germination of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 15°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

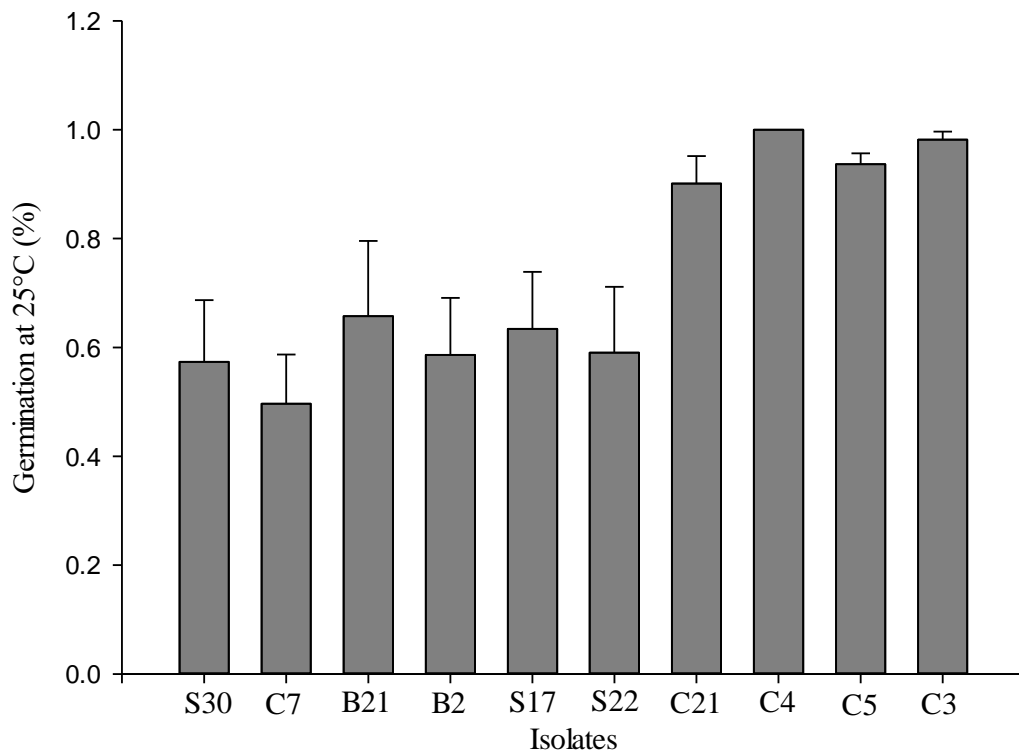


Figure 8. Germination of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 25°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

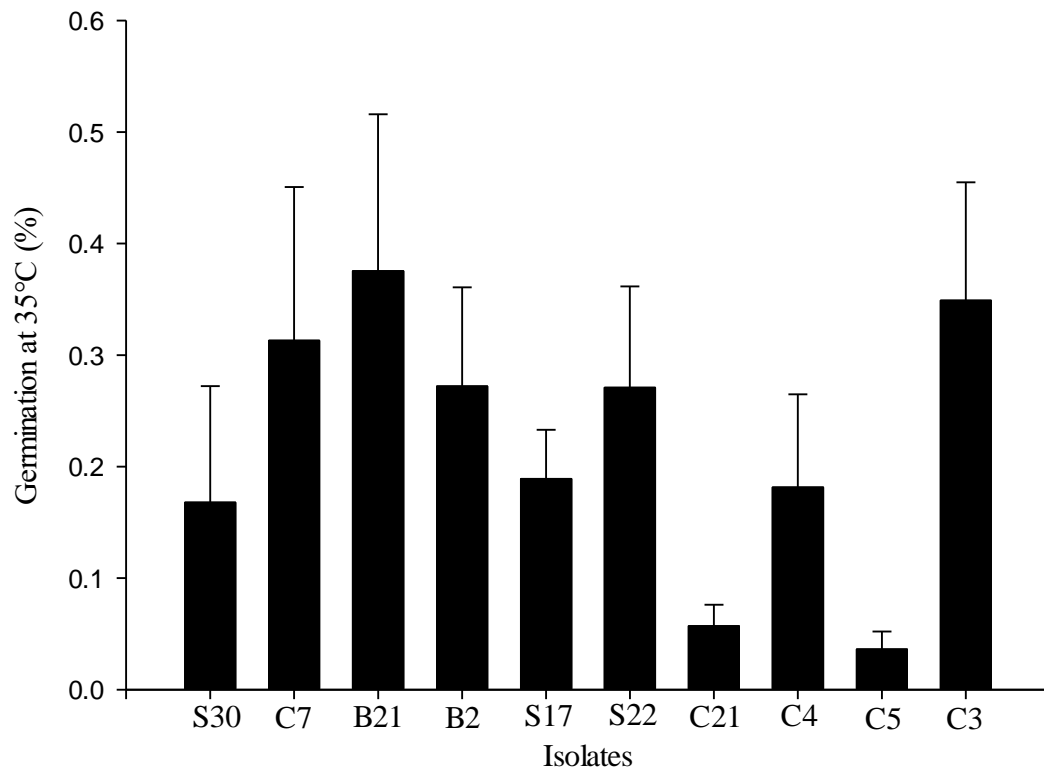


Figure 9. Germination of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 35°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

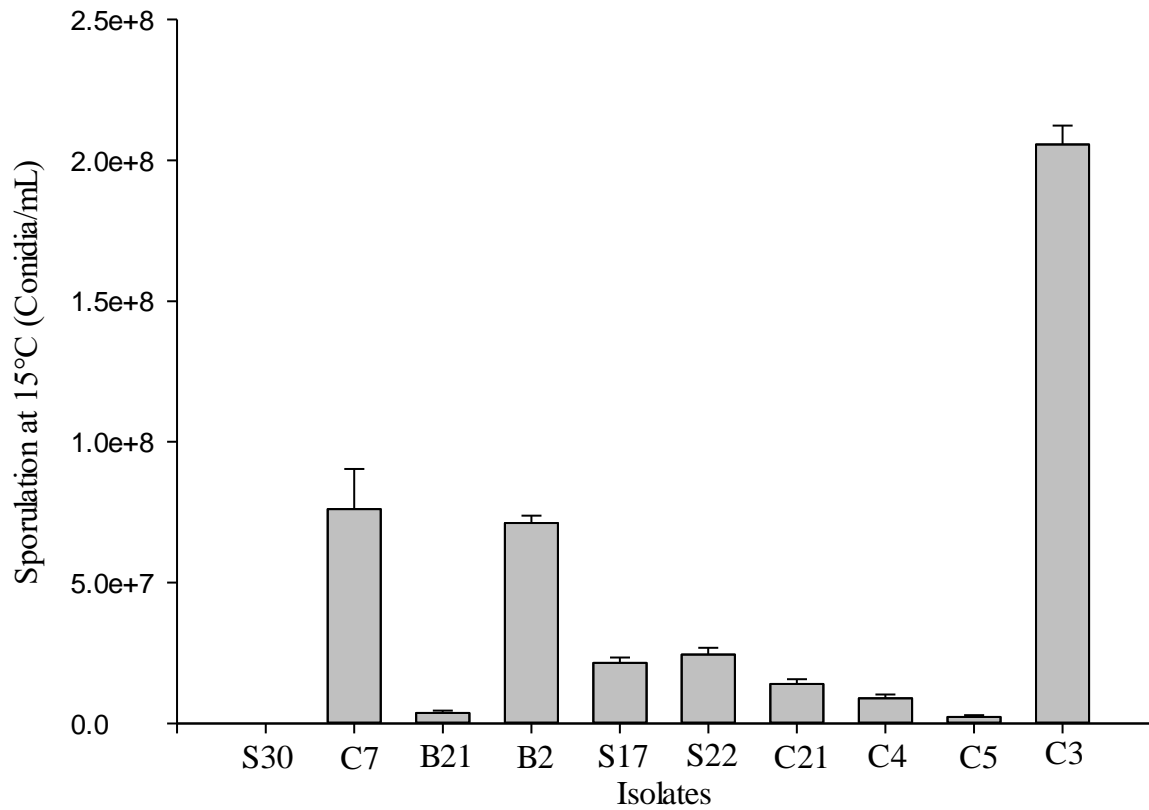


Figure 10. Sporulation of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 15°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

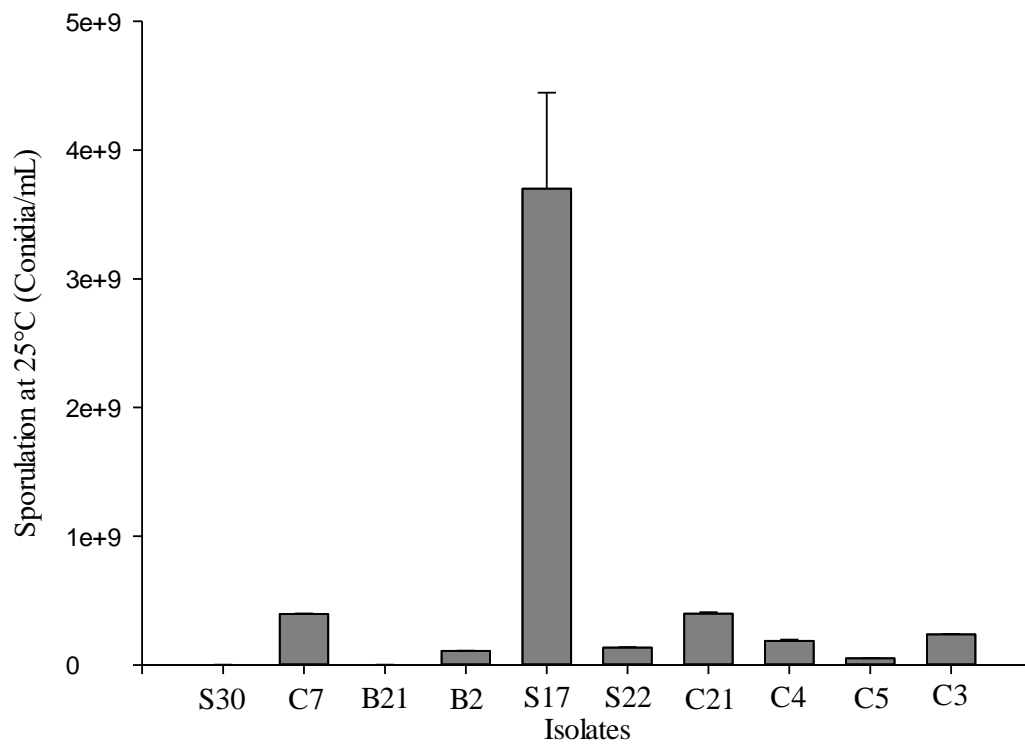


Figure 11. Sporulation of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 25°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

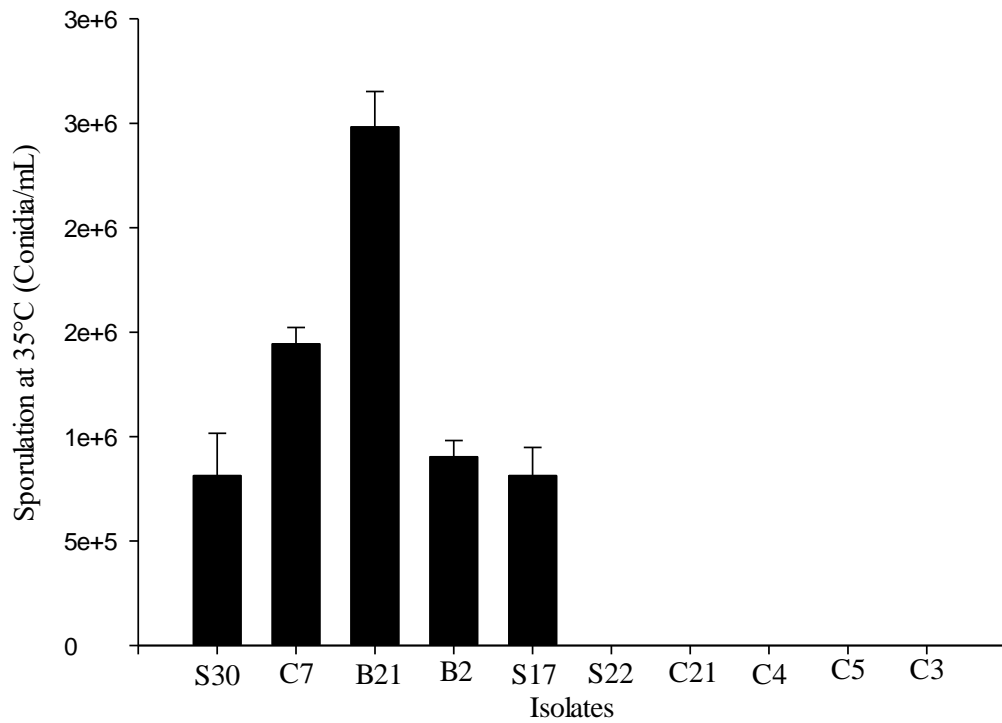


Figure 12. Sporulation of six isolates of *M. anisopliae* and four isolates of *B. pseudobassiana* at the temperature of 35°C. Error bars represents 95% confidence intervals.

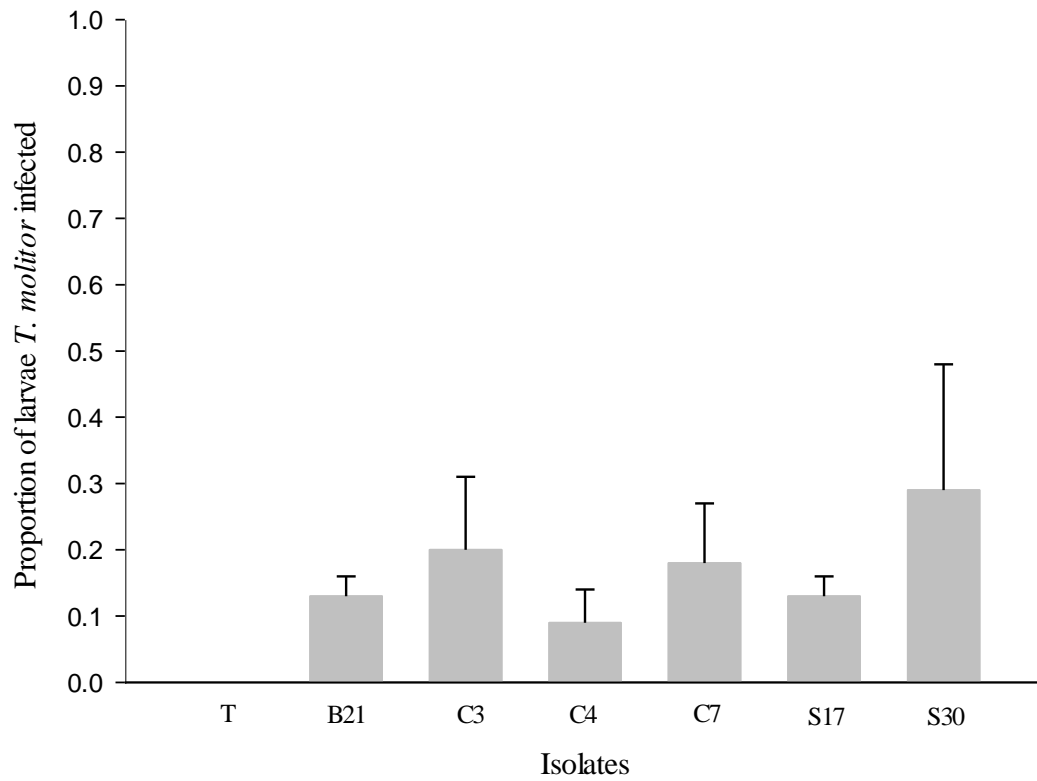


Figure 13. Mortality among *T. molitor* larvae under the isolates *M. anisopliae* and *B. pseudobassiana*. Error bars represents 95% confidence intervals.

CAPÍTULO III: Characterization of rhizobacteria associated with *Vitis vinifera* and its interaction *in vitro* with entomopathogenic fungi

Ordoñez-Beltrán, V.¹, Acosta-Muñiz, C.H.^{2*}, Orduño-Cruz, N.¹, Ríos-Velasco, C.²,
Jacobó-Cuellar, J. L.¹

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Av. Pascual Orozco s/n, Campus 1, Santo Niño, Chihuahua, Chih., México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc, Chihuahua, Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial. C.P. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México

* Correspondence author

Dr. Carlos Horacio Acosta Muñiz

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Cuauhtémoc

Río Conchos, Basaseachi, Cd. Cuauhtémoc, Chih.

México

Tel: + (52) 625 581 2920

E-mail: cacosta@ciad.mx

Abstract

The rhizosphere is a zone of unique and dynamic interaction between plant roots and soil microorganisms, which can influence their nutrition or stress tolerance. The microorganisms that colonize the roots of plants are bacteria, fungi, protozoa and algae, among others. Within these we can find growth promoting bacteria and entomopathogenic fungi. Although these groups of microorganisms inhabit the rhizosphere, studies showing the interaction of entomopathogenic fungi with promoter bacteria, in order to inoculate them together and that can provide greater protection to the plants, they are practically null. The objective of this study was to characterize rhizobacteria and evaluate their interaction *in vitro* with entomopathogenic fungi. In this study, bacteria native to the rhizosphere of *Vitis vinifera* were isolated, molecularly identified and characterized *in vitro*, in order to determine their potential to promote plant growth; in addition, *in vitro* antagonism was determined with entomopathogenic fungi isolated from the same site. Some strains showed potential to promote growth, highlighting *Chryseobacterium* sp., especially for its ability to fix atmospheric nitrogen, siderophores and Indolacetic acid production. Among the bacterial strains the antagonism was null, however, when confronted with entomopathogenic fungi, inhibition of radial growth of *Beauveria pseudobassiana* was observed by most bacteria, while in *Metarhizium anisopliae*, only by *Bacillus* sp. (CB1) and *Pseudomonas* sp. (CP1).

Keywords: rhizosphere, growth promoting bacteria, entomopathogenic fungi, characterization, antagonism.

Introduction

The rhizosphere is considered one of the most complex ecosystems (Raaijmakers et al., 2009; Hinsinger et al., 2009). Where live bacteria, fungi, nematodes, protozoa, algae, archaea and arthropods (Raaijmakers et al., 2009; Bonkowski et al., 2009; Buée et al., 2009), interact with each other and with the plants (Jambon et al., 2018). The latter are associated with a great diversity of microorganisms, especially with bacteria, which can grow in population by increasing the content of organic carbon, total nitrogen and nitrates in the rhizosphere (Zhang et al., 2018).

Interactions between plants and growth promoting rhizobacteria (PGPR; Huang et al., 2014), have been the most studied, highlighting the genres *Rhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* (Hol et al., 2014), which its function is nitrogen fixation (Mayz-Figueroa, 2004), phosphate solubilization (He et al., 2002) and siderophores production (Fernández-Scavin y Pedraza, 2013), propitiating greater availability and possibility of nutrient absorption (Morrissey et al., 2004) by the plant. PGPR help synthesize plant hormones such as indole acetic acid (IAA) and/or modulate the production of these (Hol et al., 2014), and they are also involved in the reduction of ethylene in the plant because the PGPR uses the precursor ethylene 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid (ACC) (Hayat et al., 2010), as a source of carbon. Inhibition of pathogens through competition for nutrients (Lugtenberg y Kamilova, 2009), production of antibiotics, lytic enzymes (Van Loon, 1997) or volatile products (Kumar et al., 2012), are additional effects of PGPR. Moreover, PGPR can increase tolerance to heavy metal contamination by reducing bioavailability, absorption and transport within the plant (Dary et al., 2010) and reduce drought stress, for which,

the plant involves ACC deaminase, also related to biotic stress resistance (Grichko y Glick 2001; Saleem et al., 2007). On the other hand, the plant provides root exudate microorganisms from the root that they use as substrates and signaling molecules (Bais et al., 2006).

Entomopathogenic fungi also affect the rhizosphere of plants (Leger y Wang, 2010), being the most frequent genres *Beauveria* y *Metarhizium* (Agarwal, 1990; Sandhu et al., 2001). It has been determined that entomopathogenic fungal species also promote plant growth, as reported by Dara (2013), where *B. bassiana* promoted the growth of strawberry plants in greenhouse. While in another study (Behie et al., 2012; Sasan and Bidochka, 2012), the results showed that *M. robertsii* improved root growth and nutrient uptake in forage grass and beans (Behie et al., 2012; Sasan and Bidochka, 2012).

Although in the rhizosphere of the soil, microorganisms interact with each other (Agler et al., 2016; Jambo et al., 2018), as biocontrol strategies and crop nutrition they are used mostly separately. The results of the study of Senthilraja et al., (2010) showed that under field and greenhouse conditions, the combination of two strains of *Pseudomonas fluorescens* with *Beauveria bassiana* significantly reduced leaf miner pest populations (*Apraerema modicella*) and neck rot disease in peanut plants (*Arachis hypogaea*), and also caused an increase in filling and number of pods, which resulted in higher performance. In another study, the formulation with these same species reduced the incidence of the rice leaf roller insect (*Cnaphalocrocis medinalis*) and the rice sheath blight disease (*Oryza sativa*) caused by the fungus *Rhizoctonia*

solani and increased the production of this crop (Karthiba et al., 2010). Nonetheless, these are among the few studies where they combine entomopathogenic fungi with growth promoting bacteria, being the mixture of these an emerging area of study, which could contribute to crop protection.

Due to this, in this study the characterization of PGPR isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera* and its interaction with entomopathogenic fungi isolated from the same site was raised.

Materials and methods

Samples of soil and biological material

Samples of the rhizosphere (~ 30 cm deep) were collected from vine cultivars in four locations in the State of Chihuahua, Mexico (Table 1). From each place ten subsamples of 200 g were taken, distributed in zigzag. Samples were stored at 4 ° C in the absence of light. Entomopathogenic fungi C3 (*Beauveria pseudobassiana*) and S30 (*Metarhizium anisopliae*), were originally obtained from the same site.

Isolation and purification

The bacteria were isolated from serial dilutions of 1 g of homogenized soil sample with 10 mL of a phosphate regulatory solution (34 g of NaH₂PO₄ in 1L of distilled H₂O). For the isolation of bacteria from the genera *Bacillus* and *Pseudomonas* PEMBA (Polymyxin Pyruvate Egg Yolk Mannitol Bromothymol, Blue Agar; Harmon, 1982) and King B media were used (Atlas, 1995), respectively. The Petri dishes were incubated at 28 ° C for 48h.

The isolation of nitrogen fixing bacteria was made from individual soil granules (≈ 1 mm diameter), placed in Petri dishes with Ashby Glucose Agar medium (Himedia) 1 cm away between them (Aquilanti et al., 2004), additionally 100 μ L of each dilution were seeded and incubated at 28 ° C for 7 days.

The pure isolates were inoculated in Luria-Bertani medium (LB), incubated under constant agitation at 28 ° C for 24 h and stored in 40% glycerol at -80 °C.

Molecular identification

Extraction of DNA

A colony of each isolate was inoculated in 3 mL of LB broth and incubated at 28 ° C with constant stirring at 200 rpm for 24 h. DNA extraction was performed with the Quick-DNA Fungal / Bacterial Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) following the manufacturer's instructions. The quality of the gDNA was visualized by electrophoresis in a 1% agarose gel.

PCR and sequencing

The identification of bacteria was performed by PCR amplification and sequencing of the transcribed internal space (ITS)/16S of ribosomal RNA (rRNA). For this, the primers used were 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1406R (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3'). The amplification conditions were as follows: a denaturation of the DNA at 94 ° C for 4 min, 29 cycles at 94 °C for 1 min, alignment at 55 °C for 55 s, extension for 2 min at 72 °C, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were purified using the "DNA Clean & Concentrator -5" kit (Zymo

Research, USA), and were sequenced using chemistry BigDye Terminator v3.1 and an automatic multicapillary electrophoresis system AB3730 (Applied Biosystems). Bacteria sequences (14 isolated) were edited with the Mega 7 version 7.0.26 program and aligned using the Muscle tool (Edgar, 2004). Subsequently, the BLAST algorithm was used to compare the sequences obtained with those from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, using the BLAST algorithm to verify the percentage of identity corresponding to the identified species. Additionally, a phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method, using a bootstrap with 1000 replicas.

Inoculum

A colony of each isolate was inoculated in 3 mL of the National Botanical Research Institute (NRIP) Broth, containing: 10 g de glucose, 5 g of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5 g of $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g of KCl and 0.1 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 1000 mL of distilled water (Nautiyal, 1999) with neutral pH (Walpola and Yoon, 2013), and incubated at 28 °C and 200 rpm of constant stirring for 48 h.

Growth in Nitrogen Free Broth medium (Nfb)

Filter paper (Whatman TM) circles (8 mm in diameter) were impregnated with ten microliters of the inoculum of each isolated and placed in the four cardinal points of the Petri dish with nitrogen free medium (Susilowati et al., 2015), and incubated at 28 ° C for 7 days. Subsequently, the growth area (cm^2) was determined, for this purpose, the Petri dishes were scanned and processed with the ImageJ software.

Siderophore production

500 µL of bacterial isolates grown in NRIP broth were inoculated in 5 mL of inorganic salt starch agar (ISP4; 4 g L⁻¹ of soluble starch, 2 g L⁻¹ of KNO₃, 0.5 g L⁻¹ of MgSO₄·7H₂O, 0.02 g L⁻¹ of CaCO₃ and 0.3 g L⁻¹ of yeast extract, without iron) broth. Subsequently, they were incubated at 28 °C with constant rocking (180 rpm) for 6 days. Then, the samples were shaken with a vortex (CORNING®) for 10 s and a 1000 µL aliquot was deposited in 1.5 mL microtubes, and centrifuged at 4000 rpm for 6 min. 500 µL of the supernatant was taken and 500 µL of the Casamino Acids reagent (CAS) was added according to Pérez-Miranda et al., (2007). The tubes were shaken with a vortex (CORNING®) for 10 s and allowed to stand at room temperature for 60 min. The absorbance was measured at a wavelength of 630 nm by a spectrophotometer (Eppendorf AG) (Lee et al., 2012) with modifications. The percentage of siderophores units was determined using the formula: $[(Ar-As)/Ar]*100$, Ar: Reference Absorbance, As: Absorbance of the sample.

Indolacetic Acid Production

The Indolacetic Acid (IAA) was determined according to Bautista and Gallardo (2008), with modifications. 750 µL of the preculture was inoculated in 7.5 mL of B Broth supplemented with tryptone (4 mL L⁻¹ of K₂HPO₄, 2 mL of MgSO₄, 2 mL of NH₄NO₃, 2 mL of NaCl, 5 g L⁻¹ of glucose, 20 g of tryptone and 0.1 mL of FeCl₃), adjusted to neutral pH and incubated at 28 °C and 125 rpm for 7 days. 1 mL was taken from each sample, placed in a 1.5 mL microtube and centrifuged at 3000 rpm / 15 min. 500 µL of the supernatant was transferred to a 10 mL test tube and 1 mL of Salkoswsky reagent was added (150 mL of concentrated H₂SO₄, 250 mL of distilled H₂O and 7.5 mL of

FeCl₃.6H₂O 0.5 M). The tubes were shaken and allowed to stand at room temperature for 30 min. Absorbances were measured on a spectrophotometer (Eppendorf AG) at a wavelength of 530 nm.

Phosphorus Solubilization

The determination of soluble phosphorus was performed according to Walpola and Yoon (2013) with modifications. 100 µL of each isolate was inoculated from the 'inoculum' section in Falcon tubes of 50 mL, with 20 mL of NBRIP broth containing: 10 g of glucose, 5 g of Ca₃(PO₄)₂, 5 g of MgCl₂.6H₂O, 0.25 g of MgSO₄.7H₂O, 0.2 g of KCl and 0.1 g of (NH₄)₂SO₄ in 1L of distilled water (Nautiyal 1999), which were incubated at 28 °C at 180 rpm for 5 days. NBRIP culture medium without bacteria was used as a control. The evaluation was performed every 24 h, taking 1.2 mL aliquots, which were centrifuged at 14,000 rpm / 5 min (Sharon et al., 2016). Phosphorus availability was determined using the blue phospho-molybdate method from Murphy and Riley (1962) with modifications, where 500 µL of molybdate solution (ammonium molybdate, H₂SO₄ (5M) and 300 µL of reducing solution (Ascorbic acid, distilled H₂O) was added to 1 mL of the supernatant of each sample and the tubes were allowed to stand at room temperature for 50 minutes. Absorbances were measured on a spectrophotometer (Eppendorf AG) at a wavelength of 650 nm.

***In vitro* antagonism of growth promoting bacteria**

Petri dishes (90 mm in diameter) with 5 mL of nutritive agar (Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V., Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) at 15% were used, in which another layer of 5 mL of the same 7% mild medium, previously inoculated with 10 µL of 1 × 10⁸ colony forming units (CFU) of each genus of bacteria

(Table 2), was added. After drying the medium (≈ 30 min), 10 μL aliquots were inoculated at a concentration of 1×10^8 CFU of each of the remaining genera to that applied in the soft medium. Subsequently, the Petri dishes were incubated at a temperature of 28 ± 2 °C for 48 h to observe inhibition halos (Gamard and De Boer, 1995) with modifications.

In vitro* antagonism between *Beauveria pseudobassiana* and *Metarhizium anisopliae

In vitro confrontations of entomopathogenic fungi were performed using the dual culture technique in 90 mm diameter Petri dishes, containing nutritive agar (BD Bioxon). To determine growth inhibitions among fungi C3 (*B. pseudobassiana*) and S30 (*M. anisopliae*), 9 mm diameter discs of each fungus grown in ADS were placed at 3 cm from the edge of the Petri dish, each on the opposite side of the other, and were incubated at 28 ± 2 °C in the absence of light for 15 days. The growth area (cm^2) was estimated every 72 h for 15 days, based on the surface occupied by the fungus, from images taken on a transmitted light scanner (Howell, 2003) with modifications. The antagonism was evaluated by the percentage of radial growth inhibition (PRGI) with the formula described by Ezziyyani et al., (2004), $\text{PRGI} = (R1 - R2) / R1 \times 100$, where R1 is the radius of the control fungus and R2 the radius of the fungus in the confrontation.

Antagonism between growth promoting rhizobacteria and entomopathogenic fungi

Among the 14 bacteria isolates, one of each gender was evaluated: *Exiguobacterium indicum*(AE1), *Bacillus* sp. (CB1), *Pseudomonas* sp. (CP1), *Chryseobacterium* sp. (RPC1), *Enterobacter cloacae* (NE1), *Stenotrophomonas maltophilia* (NS1) and

Acinetobacter johnsonii (NA1). The bacteria were seeded by striatum in nutrient medium and incubated at 28 °C for 24 h. Entomopathogenic fungi *B. pseudobassiana* (C3) and *M. anisopliae* (S30) were grown in Sabouraud dextrose agar (ADS: Bioxon, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V., Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México) at 28 ° C in the absence of light for 15 days. The radial growth inhibition of fungi by bacteria was evaluated in Petri dishes (90 mm in diameter) with 15 mL of nutritive agar, where 3 cm of the edge of the Petri dish was left and on one side a line (≈ 1 mm thick) of each bacterium was placed and on the opposite side a disc (9 mm in diameter) of ADS with each entomopathogenic fungus (Ansari et al., 2005) with modifications. They were incubated at 28 ± 2 °C in the absence of light for 12 days.

The area (cm²) was estimated every 72 h for 12 days, based on the surface occupied by the fungus, from images taken on an Epson transmitted light scanner, measured with the ImageJ software. The antagonism was evaluated through the PRGI (Ezziyyani et al., 2004).

Experimental design and data analysis

Data from all evaluations were analyzed using a completely randomized design. Three repetitions of each isolate were used in all analyzes. The separation of averages was performed using the Tukey test ($p \leq 0.05$), through the software SAS^{MR} (Statistic Analysis System, versión 9.0). The overall result of each isolate was designated as the value of the sum of ranges.

Results

Molecular identification

According to the molecular sequences of the 16S region and their homology with those of the NCBI database, seven genera of bacteria were identified, *Exiguobacterium* (AE1), *Pseudomonas* (CP1), *Chryseobacterium* (CC1, CC2, RPC1 and RPC2), *Bacillus* (CB1, RPB1 and RPB2), *Acinetobacter* (CA1 and NA1), *Enterobacter* (NE1), *Stenotrophomonas* (NS1 and NS2; Table 1). The sequences of the 14 isolates were deposited in the GenBank and the access numbers are shown in the phylogenetic tree (Figure 1), being *Acinetobacter lwoffii* and *Chryseobacterium* sp. the species with a greater phylogenetic distance.

Growth in Nitrogen Free Broth medium (Nfb)

All bacterial isolates grew in Nfb, with significant differences ($F=4.08$; $p<0.0009$). The isolate that showed the highest growth was of the genus *Chryseobacterium* CC1 ($1.88 \text{ cm}^2 \times \text{day}^{-1}$), while the *Stenotrophomonas* NS1 isolate ($0.12 \text{ cm}^2 \times \text{day}^{-1}$) showed the lowest growth (Figure 2A).

Siderophore production

Of the 14 isolates, 9 demonstrated the characteristic of producing siderophores (64%), presenting significant differences ($F=8.24$; $p<0.0001$). The isolates that reached the highest production of Siderophores correspond to the genus *Chryseobacterium* CC2 (39.244 %), RPC2 (36.143 %), CC1 (34.787 %), together with the *Acinetobacter johnsonii* NA1 isolate (33.624 %). However, in *Bacillus* (CB1, RPB1), *Exigobacterium* (AE1) and *Stenotrophomonas* (NS1 and NS2) genera isolates, production was nil (Figure 2B).

Indolacetic Acid Production

Of the 14 isolates, 8 had the characteristic of producing siderophores (57%), presenting significant differences ($F=6.59$; $p<0.0001$). The isolated *Chryseobacterium* sp. (CC2) showed the highest production of this hormone ($13.934 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), followed by *Pseudomonas* sp. (CP1; $8.893 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), *Bacillus* sp. (CB1; $8.893 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) and *Chryseobacterium* sp. (RPC1; $5.107 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). However, isolates from *Enterobacter* (NE1), *Acinetobacter* (NA1 and CA1) and *Bacillus* (RPB1 and RPB2) genera, AIA production was nonexistent (Figure 2D).

Phosphorus Solubilization

Of the 14 isolates, 8 had the characteristic of producing siderophores (57 %), presenting significant differences ($F=27.60$; $p<0.0001$). The isolates that solubilized the most were *Enterobacter cloacae* (NE1; $1039.3 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) and *Pseudomonas* sp. (CP1; $1008.1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). While the species with least solubilization was *Stenotrophomonas maltophilia* (NS1, $76.8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$; NS2, $51.8 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$; Figure 2C). The most acidic pH was obtained in the growth broth of the isolate *Pseudomonas* sp. (CP1), while the pH closest to the neutral by the strain *Stenotrophomonas maltophilia* (NS1).

Antagonism among growth promoting rhizobacteria

When confronting the different genera of rhizobacteria *in vitro*, no antagonism was observed between them, except for gender *Pseudomonas* (CP1) which showed an halo of 15.6 mm^2 when interacting with the isolate of the gender *Bacillus* (CB3).

Antagonism between *Beauveria pseudobassiana* and *Metarhizium anisopliae*

The interactions between entomopathogenic fungi C3 and S30 showed significant differences ($F=8.62$; $p=0.0426$) at 15 days of growth, with an area reached by *M. anisopliae* (S30) of 13.4 cm², while the witness was 20.7 cm². In the case of the isolate *B. pseudobassiana* (C3), it reached an area of 21.9 cm² compared to the witness who was 23.0 cm² (Table 2).

Antagonism between entomopathogenic fungi and rhizobacteria

The PRGI of the fungus *B. pseudobassiana* (C3) presented significant differences ($F=9.15$; $p=0.0001$), showing an inhibition in its radial growth by all bacteria, except for the isolate *Bacillus* sp. (CB1), which caused a fungus growth of 16.4 cm² compared to the control of 20.2 cm². The isolate *Metarhizium anisopliae* (S30), presented significant differences ($F=8.41$; $p=0.0002$) in PRGI, being the inhibition of radial growth caused only by bacteria *Bacillus* sp. (CB1) and *Pseudomonas* sp. (CP1), which caused a growth of 13.4 cm² and 12.3 cm² respectively, compared with 16.6 cm² of the witness (Table 4).

Discussion

Regarding to the isolated bacteria, it was found that the genera *Exiguobacterium*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* and *Stenotrophomonas* predominated in the rhizosphere of *Vitis vinífera*. In accordance with Liu et al., (2016), who also stated that little is known about the prevalence of bacteria with growth promoting characteristics of the vine rhizosphere. In a previous study, where bacteria with growth promoting characteristics were isolated from the

rhizosphere of wild vines and showing growth promoting characteristics, it was found that the predominant genera were *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Stenotrophomonas* and *Paenibacillus* (Karagöz et al., 2012); in our study, we isolated strains of the genus *Bacillus* (RPB1 and RPB2) from wild vines. In another study, where bacteria isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera* from soils with low phosphorus content, the predominant genera were *Bacillus aryabhatai*, *B. megaterium*, *Klebsiella variicola*, *Stenotrophomonas rhizophila* and *Enterobacter aerogenes* (Liu et al., 2016), in our study, these genera were isolated from Cuauhtémoc, Namiquipa and Riva Palacio. A greenhouse study revealed that the inoculation of these bacteria in grapevine seedlings of the variety *Cabernet Sauvignon* helped increase the height, thickness of the stem, dry weight of the root and the sprout over those of the control plants (Liu et al., 2016). On the other hand, endophytic bacteria of the varieties *Michurinetz* and *Marechal Foch* of grapevine have also been isolated, the predominant bacteria *Pseudomonas* and *Enterobacter* (Bell et al., 1995), same as the ones isolated from the rhizosphere in our study. Research has determined how not only the variety of the crop has an influence on the species of bacteria that colonize the rhizosphere, but also the pH and soil texture, such as the study carried out by Caliz et al., (2015), in which the abundance of nitrifying bacteria in the rhizosphere of olives had a positive correlation with the altitude, pH and clay content in the soil. The results shown in another study showed indicated that higher altitude and temperature are correlated with an increase in soil respiration and with this, the consumption of carbon and soluble nitrogen, which can influence the bacterial diversity of the soil (Lin et al., 2017).

One way to demonstrate that plants can benefit from growth promoting bacteria is through laboratory evaluations. Studies have shown that bacteria with *in vitro* growth promotion characteristics such as nitrogen fixation, siderophores production, indole acetic acid and phosphorus solubilization have proved to have some positive effect on various crops, in greenhouse and field tests (Criollo et al., 2012; Marques et al., 2010).

Nitrogen is essential for the growth of plants, forming part of the composition of proteins, nucleic acids and other cellular components; however, it is almost inactive (Mayz-Figueroa, 2004). PGPRs play an important role in the availability of N₂ in the soil, by biologically fixing this element in the form of ammonium ions (NH₄⁺) or nitrates (NO₃⁻), that can be assimilated by plants (Mayz-Figueroa, 2004). In our study, total isolates grew in a nitrogen-free medium. The isolates of *Chryseobacterium* sp. were the ones that presented a greater potential to fix N₂, being CC1 the isolate that showed the highest growth in the Nfb medium. This coincides with marques et al., (2010), who demonstrated that *Chryseobacterium palustre* and *Chryseobacterium humi* were effective in producing ammonia. In another *in vitro* study, *Chryseobacterium indologenes* (ICS-31) isolated from chickpea nodules also had a high ability to fix nitrogen (Gopalakrishnan et al., 2017). In our study, *Bacillus* genus (CB1, RPB1 and RPB2) also grew in Nfb medium. In some studies, they have found this genus to be promising in the fixation of N₂ (Seldin et al., 1984; Szilagyi-Zecchin et al., 2014), as found in the study of Liu et al., (2016) where two strains of *Bacillus aryabhatai* (JY17 and JY22), isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera* grew in a nitrogen-free environment, despite this, other studies cite the opposite (Schwartz et al., 2013;

Akinrinlola, 2018). These differences may be due to environmental and soil conditions, as well as differences between species. Although in smaller quantities the isolates *Acinetobacter johnsonii* (NA1), *Exiguobacterium indicum* (AE1), *Pseudomonas* sp. (CP1) and *Enterobacter cloacae* (NE1) also grew in the Nfb medium, other studies have reported that the genus *Acinetobacter* increases the production of some crops such as wheat, pea, chickpea, corn and barley, through nitrogen fixation (Gulati et al., 2009; Sachdev et al., 2010). Some bacteria isolated from the rice (*Oryza sativa*) rhizosphere such as *Acinetobacter soil*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas knackmussii* and *Enterobacter cloacae* (NE1), had the ability to set N₂, while opposite results occurred with *Acinetobacter calcoaceticus*, *Exiguobacterium indicum* and *Pseudomonas mosselii*, attributing the differences to the species (Susilowati et al., 2015). Although the species *Stenotrophomonas maltophilia* has been isolated from healthy plants and described as a growth promoting bacterium in several crops of agronomic importance (Idris et al., 2009), in our study, the growth of the isolate (NS1) of this species was practically nil, coinciding with the results of Susilowati et al., (2015) who failed to develop this species in this environment.

Iron is indispensable for DNA synthesis, respiration, photosynthesis and biological nitrogen fixation (Arif et al., 2012). However, this element is found in the soil in a way that is not available to living organisms, nonetheless, some strains have the ability to produce siderophores, biomolecules that act as specific iron chelating agents (Arif et al., 2012), thus increasing the availability and absorption of iron by plants. In our study, three of the isolates of the genera *Chryseobacterium* sp. (CC2, RPC2 and CC1) and

Acinetobacter johnsonii (NA1) were the ones that produced the largest units of siderophores. Studies have shown that bacteria *Chryseobacterium humi* and *Acinetobacter*, showed positive results in the production of these compounds (Marques et al., 2010, Sachdev et al., 2010). Strains of *Pseudomonas* sp. (CP1) and *Enterobacter cloacae* (NE1) also obtained positive results although in a lower percentage than those described above. On the other hand, in isolates *Bacillus* sp. (CB1), *Bacillus simplex* (RPB1), *Exiguobacterium indicum* (AE1) and *Stenotrophomonas maltophilia* (NS1 and NS2) production was nil. However, in some studies it has been found that some species of *Pseudomonas* and *Bacillus* showed positive results in siderophores production (Santos et al., 2014; Akinrinlola, 2018). In one study, strains of *Bacillus aryabhatai* (JY17 and JY22) isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera* had the ability to produce siderophores (Liu et al., 2016).

IAA is one of the hormones involved in plants's growth, modifying the morphology, surface and enzymatic activity of both the root and the aerial part (Pedraza et al., 2010). In the same way as in the previous variables, the isolate CC2 of the genus *Chryseobacterium* was the one that produced higher amounts of IAA. The genera *Pseudomonas* sp. (CP1), *Bacillus* sp. (CB1) and *Chryseobacterium* sp. (RPC1) also produced IAA. These results indicate that the species plays an important role in the production of this growth hormone, since strains CC2 and RPC1 were isolated from different places. Research has revealed that species *Chryseobacterium palustre*, *Chryseobacterium humi*, as well as genders *Bacillus* and *Pseudomonas* produce IAA (Marques et al., 2010; Kumar et al., 2012; Akinrinlola, 2018; Criollo et al., 2012;

Susilowati et al., 2015). In another study, strains of *Bacillus aryabhatai* (JY17 and JY22), isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera* were positive in the production of IAA (Liu et al., 2016). Although in lower concentration, the isolates (NS1 and NS2) of *Stenotrophomonas maltophilia* also produced this hormone, which matches what was found in other studies (Criollo et al., 2012; Susilowati et al., 2015). In the isolates *Enterobacter cloacae* (NE1), *Acinetobacter johnsonii* (NA1), *Bacillus* sp. (RPB2), *Bacillus simplex* (RPB1), *Acinetobacter lwoffii* (CA1) and *Exiguobacterium indicum* (AE1), IAA production was nil. Genera *Enterobacter* and *Exiguobacterium* have demonstrated their ability to produce AIA and promote plant growth in other studies (Mirza et al., 2001; Susilowati et al., 2015).

Phosphorus is an important nutrient for plant growth; however, its availability in the soil is low because it is found as insoluble phosphates of iron, aluminum and calcium (Alam et al., 2002). Some soil microorganisms play an important role, making P available for plants (Richardson, 2001) through the production of organic acids (oxalic, fumaric and citric) and phosphatase enzymes that dissolve and/or chelates phosphate minerals (He et al., 2002), facilitating the solubilization of inorganic phosphorus and other nutrients (Ferraris and Couretot, 2004). In our study, the bacteria that solubilized more phosphorus were *Bacillus* sp. (CB1), *Enterobacter cloacae* (NE1) and *Pseudomonas* sp. (CP1); being these last two in which a greater acidity was found in the environment where they grew, this can be attributed to a greater production of organic acids to solubilize the phosphorus (Rodríguez et al., 2006). In some studies they have found that genders *Bacillus*, *Pseudomonas*, as well as the species *B. megaterium*, *P.*

pseudoalcaligenes, *P. mosselii*, *Enterobacter ludwigii* were efficient phosphorus solubilizers (Wang et al., 2017, Akinrinlola, 2018; Han and Lee, 2006; Criollo et al., 2012; Susilowati et al., 2015). *Acinetobacter* genus isolates also obtained positive results, especially *Acinetobacter johnsonii* (NA1), while isolates *Stenotrophomonas maltophilia* (NS1 and NS2) and *Chryseobacterium* sp. (CC1) were less effective in solubilizing P, being the growth broth of NS1 the one who obtained the highest pH, probably due to a lower production of organic acids. These results match what was found by Susilowati et al., (2015), who obtained positive results with the *Acinetobacter soli* species, while two strains of *Stenotrophomonas maltophilia* were unable to solubilize phosphates (Susilowati et al., 2015), therefore it is inferred that this species does not possess this attribute.

In our evaluation of interaction between PGPRs, growth inhibition halos were not observed when in contact with each other. No *in vitro* studies were found in which the interaction of PGPR has been evaluated; however, greenhouse and field studies have demonstrated the effectiveness of PGPR consortia in promoting plant growth (Pandey and Maheshwari, 2007; Raja et al., 2006) and biological combat. The results of Nandakumar et al., (2001) showed that with the mixture of three strains of *Pseudomonas fluorescens* the incidence of sheath blight disease, caused by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, was significantly reduced, in greenhouse and field conditions compared to individual strains. In the same way in another study, two strains of *Pseudomonas fluorescens* reduced sheath blight and the incidence of rice leafworm insects (Commare et al., 2002).

Results of antagonism *in vitro* between *Beauveria pseudobassiana* (C3) and *Metarhizium anisopliae* (S30), showed that both inhibited each other. However, the inhibition was greater in S30, showing that *B. pseudobassiana* is more likely to grow than *M. anisopliae* by competing for space and nutrients. Acuña-Jiménez et al., (2015) and Bukhari et al., (2011), when evaluating the pathogenicity of strains of these two species of entomopathogenic fungi against the tobacco outbreak worm (*Heliothis virescens*) and pupae of the complex *Anopheles gambiae*, respectively, reported a positive and synergistic interaction. In addition to this, the fungi *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum* and *Trichoderma asperellum* together significantly increased the fresh and dry biomass of soybean roots and colonization of arbuscular mycorrhizae compared to not inoculated soybeans (*Glycine max*; Carvalho, 2018).

According to the results obtained from the interaction between PGPR and entomopathogenic fungi, there was a significant reduction in the growth of *M. anisopliae* (S30) and *B. pseudobassiana* (C3), especially in C3, by the majority of PGPR. However, no inhibition zones were observed, so it is inferred that the antagonism was due to competition of space and nutrients. An *in vitro* antagonism study showed that two strains of *Pseudomonas fluorescens* were compatible with *B. bassiana*, where the results showed a reduction in leafworm insects, a decrease in sheath blight and a significant increase in rice grain yield under greenhouse and field conditions (Karthiba et al., 2010).

In addition to promoting plant growth, PGPR can contribute to biological control. It has been determined that these bacteria have latent defense mechanisms that can be activated systemically when the plants are faced with biotic or abiotic stress (Karthiba et al., 2010). In a study made by Bong and Sikorowski (1991), it was found that the bacteria *P. maltophilia*, inoculated in the diet of corn earworm larvae (*Helicoverpa zea*), caused a reduction in the growth of these. Similarly, Yaman et al., (1999) reported that a suspension of *P. fluorescens* caused a mortality of 20% of the chestnut weevil (*Curculio elephas*).

Conclusion

The bacteria isolated from the rhizosphere of *Vitis vinífera* were *Exiguobacterium indicum*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Bacillus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* sp., *Bacillus* sp., and *Bacillus simplex*.

The isolated CC1 (*Chryseobacterium* sp.) obtained greater growth in Nfb medium and produced greater units of siderophores, the isolated CC2 (*Chryseobacterium* sp.) produced more indole acetic acid, while the NE1 (*Enterobacter cloacae*) was the best phosphorus solubilizer. The isolates that generally showed the greatest growth promoting potential were RPC1 (*Chryseobacterium* sp.), CB1 (*Bacillus* sp.) and CC2 (*Chryseobacterium* sp.) (Table 6). However, it should be noted that some who do not have high scores can stand out in any of the variables, which is also important, for example CP1 (*Pseudomonas* sp.) in the production of IAA.

Entomopathogenic fungus growth *M. anisopliae* was less affected by rhizobacteria compared to *B. pseudobassiana*, therefore, it could have more possibilities to act synergistically with these.

In vitro evidence showed the potential of some isolates to promote plant growth and to interact positively with entomopathogenic fungi *M. anisopliae* and *B. pseudobassiana*. However, studies in the greenhouse and in the field are required to determine the effectiveness of the isolates individually and in a consortium, which could contribute to obtaining better results in the promotion of plant growth and biological control.

Acknowledgment

The first author thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the support to carry out this research and the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Author contributions

O. B. V., wrote the article, A. M. C. H. and R. V. C., material and equipment and corrected of article, O. C. N. and J. C. J. L. corrected the article.

References

Acuña-Jiménez, M., N. M. Rosas-García, M. López-Meyer, J. C. Saíz-Hernández, M. Mundo-Ocampo and C. García-Gutiérrez. 2015. Pathogenicity of microencapsulated insecticide from *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius). Southwest Entomol. 40(3): 531-539.

Agarwal, G.P. 1990. Entomogenous fungi in India and management of insect pests. Indian Phytopathol. 43:131-142.

Agler, M.T., J. Ruhe, S. Kroll, C. Morhenn, S. T. Kim, D. Weigel and E. M. Kemen. 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. PLoS Biol. 14:1-31.

Akinrinlola, R. J. 2018. Evaluation of bacillus strains for plant growth-promotion potentials on corn (*Zea mays*), wheat (*Triticum aestivum*), and soybean (*Glycine max*).

Alam, S., S. Khalil, N. Ayub and M. Rashid. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. Int J Agric Biol. 4(4): 454-458.

Ansari, M. A., Tirry, L., and M. Moens. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. BioControl. 50(3): 465-475.

Aquilanti, L., F. Favilli and F. Clemeti. 2004. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. Soil Biol. Biochem. 36:1475-1483.

Arif, K., G. Archana and A. J. Desai. 2012. Engineering heterologous iron siderophore complex utilization in rhizobia: Effect on growth of peanut and pigeon pea plants. Appl Soil Ecol. 53: 65-73. ISSN 0929-1393.

Atlas, R. M. 1995. The Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press, Boca Raton, p. 197.

Bais, H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy and J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol.* 57:233–266.

Bautista, L. X. C., and I. R. Gallardo. 2008. Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (Ácido Indol Acético y Giberelinas) en cultivos microbianos. Pontificia Universidad Javeriana.

Behie, S. W., P. M. Zelisko and M. J. Bidochka. 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science.* 336: 1576-1577.

Bell, C. R., G. A. Dickie, W. L. G. Harvey and J. W. Y. F. Chan. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can J Microbiol.* 41(1):46-53.

Bong, C. F. J., and P. P. Sikorowski. 1991. Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus and bacterial contamination on growth and development of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie). *J Invert Pathol.* 57:406–412.

Hol, W. G., de Boer, W., & Medina, A. (2014). Beneficial interactions in the rhizosphere. In *Interactions in soil: promoting plant growth* (pp. 59-80). Springer, Dordrecht.

Bonkowski, M., C. Villenave and B. Griffiths. 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant Soil.* 321: 213-233.

Buée, M., W. De Boer, F. Martin, L. van Overbeek and E. Jurkevitch. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil*. 321: 189-212.

Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of microbiology & biology education: JMBE*, 12(1), 51.

Alexander M. (1980). *Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT Editores, México pp. 234-362.

Nautiyal SC. (1999). An Efficient Microbiological Growth Medium for Screening Phosphate Solubilizing Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 170:265-270.

Russell EW. (1980). *Soil conitins & plant growth*. 10 th ed. Longman, London.

Stewart JWB, Sharpley AN. (1987). Controls on dynamics of soil and fertilizer phosphorus and sulfur. IN: *Soil Fertility and Organic matter as critical components on production systems*. Soil Science Society of America, St. Paul, MN.

Atlas RM. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4a ed. Pearson Educación SA. Madrid, España pp. 429-430.

Azcón R, Barea JM. (1997). Mycorrhizal dependency of a representative plant species in a Mediterranean shrublands (*Lavanduca spica* L.) as key factor to its use for revegetation strategies in a desertification-threatened areas. *Applied Soil Ecology* 7: 83-92.

Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. (2006). Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33–41.

Bukhari, T., W. Takken and C. J. Koenraadt. 2011. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasite Vector*. 4(1): 23.

Caliz, J., M. Montes-Borrego, X. Triado-Margarit, M. Metsis, B. B., Landa and E. O. Casamayor. 2015. Influence of edaphic, climatic, and agronomic factors on the composition and abundance of nitrifying microorganisms in the rhizosphere of commercial olive crops. *PloS one*, 10(5): e0125787.

Carvalho, R.C.D. 2018. Consórcio de cinco fungos promovendo o crescimento vegetal e a colonização micorrízica arbuscular na soja.

Commare, R. R., Nandakumar, R., Kandan, A., Suresh, S., Bharathi, M., Raguchander, T., and Samiyappan, R. 2002. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection*. 21(8): 671-677.

Criollo, P.J., M. Obando, L. Sánchez and R. Bonilla. 2012. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*. 13(2): 189-195.

Dara, S. K. 2013. Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* promotes strawberry plant growth and health. *UCANR eJournal Strawberries and Vegetables*, 30.

Dary, M., M. A. Chamber-Perez, A. J. Palomares, E. Pajuelo. 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater.* 177: 323–330.

Ezziyani, M., C. P. Sánchez, M. E. Requena, L. Rubio and M. E. C. Castillo. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei*–Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *An Biol.* 26: 61-68.

Fernández-Scavin, A., and R. O. Pedraza. 2013. The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A (eds) *Bacteria in agrobiology: crop productivity*. Springer, Heidelberg, pp 265–285.

Ferraris, G., and L. Courerot. 2004. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas* spp) en trigo. *Rev. tecnol. agropecu.* 9: 37-39.

Gamard, P.A., and S. H. De Boer. 1995. Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato. *Eur J Plant Pathol.* 101(5): 519-525.

Gopalakrishnan, S., V. Srinivas and S. Samineni. 2017. Nitrogen fixation, plant growth and yield enhancements by diazotrophic growth-promoting bacteria in two cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 11:116-123.

Grichko, V.P., and B. R. Glick. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem.* 39:11–17.

Gulati, A., P. Vyas., P. Rahi., and R. C. Kasana. 2009. Plant growth promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter* rhizosphaerae strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Curr. Microbiol.* 58: 371-377.

Han, H. S., and K. D. Lee. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ.* 52(3): 130.

Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid and I. Ahmed. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579–598.

He, Z. L., W. Bian and J. Zhu. 2002. Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 33: 647-663.

Hinsinger, P., A. G. Bengough, D. Vetterlein and I. M. Young. 2009. Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant Soil.* 321: 117-152.

Hol, W. G., W. de Boer and A. Medina. 2014. Beneficial interactions in the rhizosphere. In *Interactions in soil: promoting plant growth* (pp. 59-80). Springer, Dordrecht.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87(1): 4-10.

Huang, X. F., J. M. Chaparro, K. F. Reardon, R. Zhang, Q. Shen and J. M. Vivanco. 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*. 92(4): 267-275.

Idris, A., N. Labuschagne and L. Korsten. 2009. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *J Agric Sci*. 147: 17-30.

Jambon, I., S. Thijs, N. Weyens and J. Vangronsveld. 2018. Harnessing plant-bacteria-fungi interactions to improve plant growth and degradation of organic pollutants. *J Plant Interact*. 13(1): 119-130.

Karagöz, K., F. Ateş, H. Karagöz, R. Kotan and R. Çakmakçı. 2012. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. *Eur J Soil Biol Journal*. 50:144-150.

Karthiba, L., K. Saveetha, S. Suresh, T. Raguchander, D. Saravanakumar and R. Samiyappan. 2010. PGPR and entomopathogenic fungus bioformulation for the synchronous management of leaf folder pest and sheath blight disease of rice. *Pest Manag Sci: formerly Pesticide Science*. 66(5): 555-564.

Kumar, G. P., N. Kishore, E. L. D. Amalraj, S. Ahmed, A. Rasul and S. Desai. 2012. Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regul*. 67:133–140.

Leger, R. J. S., and C. Wang. 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85(4): 901-907.

Lin, Y. T., Z. Jia, D. Wang and C. Y. Chiu. 2017. Effects of temperature on the composition and diversity of bacterial communities in bamboo soils at different elevations. *Biogeosciences*, 14(21): 4879-4889.

Liu, M., X. Liu, B. S. Cheng, X. L. Ma, X. T. Lyu, X. F. Zhao and Y. L. Fang. 2016. Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Span J Agric Res.* 14(4):26.

Lugtenberg, B., and F. Kamilova. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 63:541–556.

Marques, A. P., C. Pires, H. Moreira, A. O. Rangel and P. M. Castro. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol Biochem.* 42(8): 1229-1235.

Mayz-Figueroa, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola.* 4(1): 1-20.

Mirza, M. S., W. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand and K. A. Malik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil.* 237(1): 47-54.

Morrissey, J. P., J. M. Dow, G. L. Mark and F. O'Gara. 2004. Are microbes at the root of a solution to world food production?. *EMBO reports*, 5(10): 922-926.

Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta.* 27: 31-36.

Nandakumar, R., S. Babu, R. Viswanathan, J. Sheela, T. Raguchander and R. Samiyappan, 2001. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *Biocontrol.* 46(4): 493-510.

Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 265-270.

Pandey, P., and D. K. Maheshwari. 2007. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. *Canadian journal of microbiology*, 53(2): 213-222.

Pedraza, R.O., K. R. Teixeira, A. F. Scavino, I. G. de Salamone, B. E. Baca, R. Azcón and R. Bonilla. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria.* 11(2): 155-164.

Pérez-Miranda, S., N. Cabirol, R. George-Téllez, L.S. Zamudio-Rivera and F. J. Fernández. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods.* 70(1): 127-131.

Raaijmakers, J., T. Paulitz, C. Steinberg, C. Alabouvette and Y. Moëgne-Loccoz. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil*, 321(1–2): 341–361. doi:10.1007/s11104-008-9568-6.

Raja, P., S. Uma, H. Gopal and K. Govindarajan. 2006. Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. *J Biol Sci*. 6: 815-823.

Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Funct Plant Biol*. 28(9): 897-906.

Rodríguez, H., R. Fraga, T. Gonzalez and Y. Bashan. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth promoting bacteria. *Plant and Soil*. 56: 492-504.

Sachdev, D., P. Nema, P. Dhakephalkar, S. Zinjarde and B. Chopade. 2010. Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. *Microbiol. Res*. 165(8): 627-638.

Saleem, M., M. Arshad, S. Hussain and A. S. Bhatti. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 34:635–648.

Sandhu, S.S., S. E. Unkles, R.C. Rajak and J. R. Kinghorn. 2001. Generation of benomyl resistant *Beauveria bassiana* strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. *Biosci Tech*. 11: 245-250.

Santos, S., I. F. Neto, M. D. Machado, H. M. Soares and E. V. Soares. 2014. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. *Mol Biotechnol.* 172(1): 549-560.

Sasan, R. K. and M. J. Bidochka. 2012. The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Amer. J. Bot.* 99:101-107.

SAS^{MR} Institute Inc. statistical analysis software, versión 9.0.

Schwartz, A., I. Ortiz, M. Maymon, C. Herbold, N. Fujishige, J. Vijanderan and D. DeMason. 2013. *Bacillus simplex* - a little known PGPB with anti-fungal activity—alters pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agron J.* 3(4): 595-620.

Seldin, L., J. D. Van Elsas and E. G. C. Penido. 1984. *Bacillus azotofixans* sp.nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 34(4), 451-456.

Senthilraja, G., Anand, T., Durairaj, C., Kennedy, J. S., Suresh, S., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2010). A new microbial consortia containing entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* for simultaneous management of leafminers and collar rot disease in groundnut. *Biocontrol Science and Technology*, 20(5), 449-464.

Susilowati, D.N., I. M. Sudiana, N. R. Mubarik and A. Suwanto. 2015. Species and functional diversity of rhizobacteria of rice plant in the coastal soils of Indonesia. *Indones. J.Agric. Sci.* 16(1): 39-50.

Szilagyi-Zecchin, V.J., A. C. Ikeda, , M. Hungria, D. Adamoski, V. Kava-Cordeiro, C. Glienke and L. V. Galli-Terasawa. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express.* 4(1): 26.

Van Loon, L. C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol.* 103:753–765.

Walpola, B.C., and M. H. Yoon. 2013. *In vitro* solubilization of inorganic phosphates by phosphate solubilizing microorganisms. *AFR J Microbiol Res.* 7(27): 3534-3541.

Wang, Z., G. Xu, P. Ma, Y. Lin, X. Yang and C. Cao. 2017. Isolation and characterization of a phosphorus-solubilizing bacterium from rhizosphere soils and its colonization of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*). *Front Microbiol.* 8: 1270.

Yaman, M., Z. Demirbag and A. O. Belduz. 1999. Investigations on the bacterial flora as a potential biocontrol agent of chestnut weevil, *Curculio elephas* (Coleoptera: Curculionidae) in Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 54: 625-630.

Zhang, C., G. Liu, Z. Song, J. Wang and L. Guo. 2018. Interactions of soil bacteria and fungi with plants during long-term grazing exclusion in semiarid grasslands. *Soil Biol Biochem.* 124: 47-58.

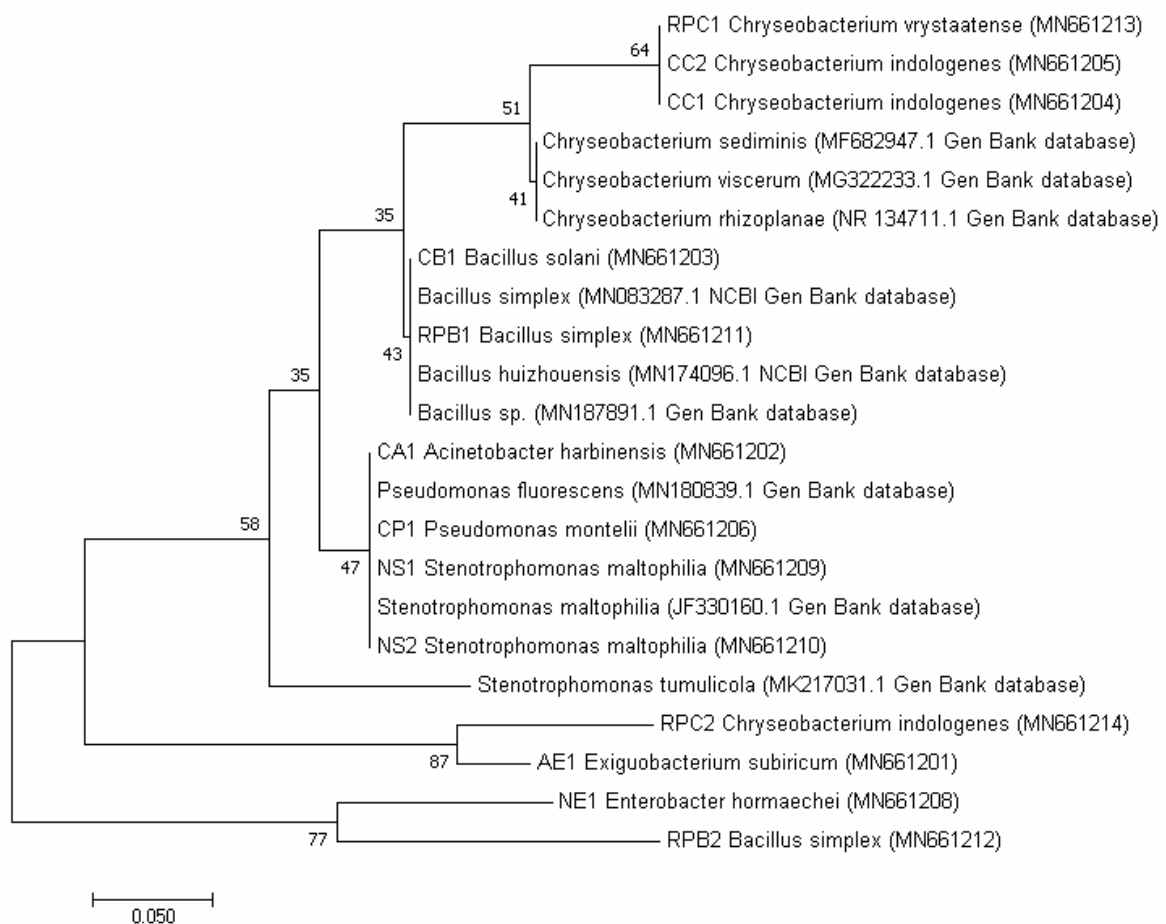


Figure 14. Bacterial dendrogram constructed with the sequences of the ITS 16S rDNA region, based on the Neighbor-Joining method. The access numbers of each of the isolated bacteria are shown.

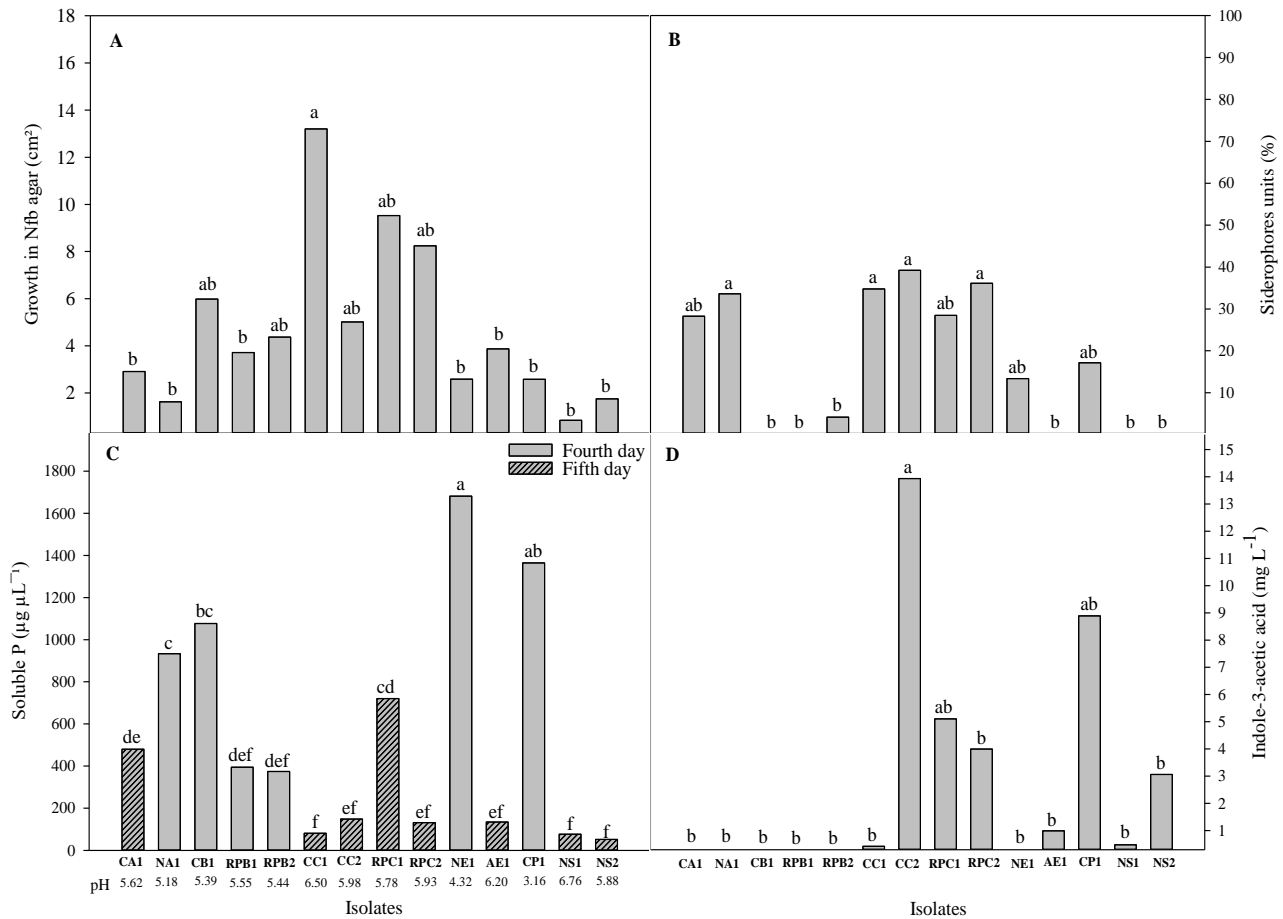


Figure 15. Characterization of PGPR, A: Growth in Nfb medium, B: Production of siderophores, C: Solubilization of Phosphorus, D: Synthesis of Indo-acetic acid. The means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test).

Table 2. Sites for collecting soil samples associated with the rhizosphere of *Vitis vinifera* in the state of Chihuahua, Mexico. Number of isolates of *Beauveria* and *Metarhizium* obtained in each locality.

Municipality	Locality	Geographic		Entomopathogenic fungi	
		location	Altitude	<i>Beauveria</i> <i>pseudobassiana</i>	<i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>
		(Latitude, Longitude)	(masl)		
Aldama	Los Leones	28.95°N, -105.92°O	1357		
Cuauhtémoc	Bustillos	28.47°N, -106.66°O	2060		2
Cuauhtémoc	Cuahtémoc	28.41°N, -106.88°O	2048	4	1
Namiquipa	Soto Maynez	28.96°N, -107.54°O	1916		3
Riva Palacio	San Andrés	28.54°N, -106.50°O	1764		

Table 3. Bacteria isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera* in the state of Chihuahua, Mexico

Specie	Strain	Host	Geographical origin
<i>Exiguobacterium subiricum</i>	AE1	Suelo	Aldama
<i>Acinetobacter harbinensis</i>	CA1		Cuauhtémoc
<i>Bacillus solani</i>	CB1		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	CC1		
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	CC2		
<i>Pseudomonas montelii</i>	CP1		
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	NA1		Namiquipa
<i>Enterobacter hormaechei</i>	NE1		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NS1		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NS2		
<i>Chryseobacterium vrystaatense</i>	RPC1		Riva Palacio
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	RPC2		
<i>Bacillus simplex</i>	RPB1		
<i>Bacillus simplex</i>	RPB2		

Table 4. Inhibition of radial growth among entomopathogenic fungi

Species (strain)	Inhibition (%)*	
	<i>Beauveria</i> <i>pseudobassiana</i> (C3)	<i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i> (S30)
<i>Beauveria</i>		
<i>pseudobassiana</i> (C3)	0.0 ± 0.0a (Control)	34.9 ± 2.2b
<i>Metarhizium anisopliae</i>		
(S30)	5.2 ± 1.5b	0.0 ± 0.0a (Control)

* Mean ± standard deviation (n = 3). The means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test).

Table 5. Inhibition of radial growth of entomopathogenic fungi by growth promoting bacteria isolated from the rhizosphere of *Vitis vinifera*.

Species (strain)	Inhibition (%) [*]	
	<i>Beauveria pseudobassiana</i> (C3)	<i>Metarhizium anisopliae</i> (S30)
<i>Exiguobacterium indicum</i> (AE1)	46.2 ± 3.4bc	12.8 ± 3.5abc
<i>Bacillus</i> sp. (CB1)	18.7 ± 2.7ab	19.4 ± 0.3bc
<i>Pseudomonas</i> sp. (CP1)	48.4 ± 10.1bc	26.1 ± 3.6c
<i>Acinetobacter johnsonii</i> (NA1)	42.9 ± 4.9bc	12.7 ± 3.7abc
<i>Enterobacter cloacae</i> (NE1)	44.0 ± 2.8bc	0.4 ± 0.3a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (NS1)	46.7 ± 14.2bc	11.3 ± 3.1ab
<i>Chryseobacterium</i> sp. (RPC1)	79.7 ± 1.4c	0.0 ± 0.0a
Testigo	0.0 ± 0.0a	0.0 ± 0.0a

* Mean ± standard deviation (n = 3). The means with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey test).

Table 6. Summary of the potential of PGPR

Strain	PGPR evaluation				Sum of Ranges
	N ₂	Siderophores	P soluble	IAA	
CA1	4.5	8.5	9	5.5	27.5
NA1	4.5	12.5	11	5.5	33.5
CB1	11	3.5	12	12	38.5*
RPB1	4.5	3.5	0.5	5.5	14.0
RPB2	11	3.5	7.5	5.5	27.5
CC1	14	12.5	3.5	5.5	35.5
CC2	11	12.5	3.5	14	41.0*
RPC1	11	8.5	10	12	41.5*
RPC2	11	12.5	3.5	5.5	32.5
NE1	4.5	8.5	14	5.5	32.5
AE1	4.5	3.5	3.5	5.5	17.0
CP1	4.5	8.5	13	12	38.0
NS1	4.5	3.5	3.5	5.5	17.0
NS2	4.5	3.5	3.5	5.5	17.0

CONCLUSION GENERAL

Se aislaron cuatro cepas de hongos entomopatógenos *B. pseudobassiana* y seis de *M. anisopliae* de la rizósfera de *Vitis vinifera*. Todos los aislados fueron afectados *in vitro* en su desarrollo (germinación, crecimiento y esporulación) por la temperatura; sin embargo, de manera general *M. anisopliae* mostró un mejor resultado que *B. pseudobassiana*. La temperatura de 25°C fue la óptima, seguida por la de 15°C y por último 35°C.

Se aisló una cepa de *Exiguobacterium subiricum*, dos del género *Acinetobacter* (*A. harbinensis* y *A. johnsonii*), tres del género *Bacillus* (una *B. solani* y dos *B. Bacillus simplex*), cuatro del género *Chryseobacterium* (tres *Ch. indologenes* y una *Ch. vrystaatense*), una de *Pseudomonas montelii*, una de *Enterobacter hormaechei* y dos de *Stenotrophomonas maltophilia*. Los aislados que de manera general *in vitro* mostraron mayor potencial de promoción del crecimiento fueron *Chryseobacterium vrystaatense*, *Chryseobacterium indologenes* y *Bacillus solani*.

El crecimiento de la especie entomopatógena *M. anisopliae* se vio menos afectado por las rizobacterias en comparación con *B. pseudobassiana*, por lo tanto, podría tener más posibilidades de actuar sinérgicamente con estas.

La evidencia *in vitro* mostró el potencial de algunos aislados de hongos entomopatógenos para desarrollarse a distintas temperaturas y ser utilizados en control biológico, así como también de algunos aislados de rizobacterias para promover el crecimiento vegetal. Sin embargo, es necesario realizar estudios en invernadero y en campo para determinar la eficacia de estos aislados de manera individual y en consorcio para control de plagas y enfermedades, así como para promover el crecimiento vegetal.