



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del potencial de *Bacillus velezensis* 83 como agente de control biológico y promotor del crecimiento de plantas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Karina Alejandra Balderas Ruíz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Leobardo Serrano Carreón  
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Esperanza Martínez Romero  
[Centro de Ciencias Genómicas](#)  
Dr. Ángel Arturo Guevara García  
[Instituto de Biotecnología](#)

Ciudad de México. Octubre, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Leobardo Serrano Carreón. Durante el periodo de ejecución de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 247473 y 251848, con la beca de Doctorado otorgada por CONACyT 361862, presupuesto UNAM-DGAPA-PAPIIT (proyectos IN206715 y IG200618) y el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

## ***Dedicatoria***

Por su amor, cariño y apoyo incondicional:

A mi familia Arturo y Mia

A mis padres Rosalba y Javier

A mi hermano Iván



## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Leobardo Serrano-Carreón**, por su gran contribución a mi formación académica y profesional, y por siempre confiar en mí para desarrollar este trabajo de investigación.

Al **Dr. Galindo Fentanes** por su contribución a mi formación académica y profesional, y por su participación como invitado en el comité tutorial.

Al comité tutorial: **Dra. Esperanza Martínez Romero**, **Dr. Arturo Guevara García** por su tiempo, aportación de conocimiento, cuestionamientos, sugerencias y correcciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la **Dra. Celia Flores Ocampo**, por su tiempo, trabajo técnico y gestiones administrativas durante mi estancia en el laboratorio para poder desarrollar mi trabajo.

Al personal de la **Planta Piloto** del IBT-UNAM: **Biol. Mario Caro Bermudez** y **M. en C. J. Raunel Tinoco Valencia**, por su apoyo técnico.

A **I.B. Margarita Venegas** (Maggi) y **Biol. Clara Gómez** (Clarita) por su disposición, esfuerzo y dedicación para contribuir al desarrollo del conocimiento en esta investigación, también por permitirme transmitirles mis conocimientos y experiencias de trabajo con control biológico.

A mis compañeros de la línea de investigación de Control Biológico: **Dr. Sergio A. Cristiano-Fajardo**, **M.C. Agustín Luna-Bulbarela**, **M.C. Esmeralda Soriano-Peña**, y a todos los integrantes del **grupo Galindo**, siempre por compartir espacios, conocimientos y experiencias.

Al **grupo del Dr. Arturo Guevara**, por su apoyo y aportación de conocimiento para realizar experimentos con Arabidopsis.

Al personal de la empresa **Agro&Biotecnia S. de R.L. de C.V.**, por proporcionar material biológico y otros materiales, para producir los formulados con los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 utilizados para desarrollar varios de los experimentos de esta investigación.

Al personal de **FIRA** (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura) unidad Tezoyuca (Emiliano Zapata, Morelos, México), en especial al **Ing. Edivel Leyva** y el personal a su cargo (**Ing. Juan Méndez**, **Ing. Ramón González**) por su apoyo técnico y las enseñanzas durante el desarrollo del trabajo.

Al **Dr. Sergio Aranda-Ocampo** (Fitopatólogo del Colegio de Postgraduados), **Dr. Mauricio Trujillo-Roldán** y **Dra. Adriana Valdez-Cruz** (Instituto de Investigaciones Biomédicas), **Dr. Antonio M. Juárez** (Instituto de Ciencias Físicas-UNAM). Por sus aportaciones, asesoría y colaboración durante todo el trabajo experimental con el cultivo de jitomate en invernadero.

Al **Dr. Mario A. Miranda-Salcedo** (INIFAP, Apatzingán, Michoacán, México) por su apoyo y aportación de conocimiento para realizar pruebas de control biológico en cultivos de mango en Michoacán.

## ABREVIATURAS

Abreviatura por sus siglas en inglés	Significado en inglés	Significado en español
4-Cl-IAA	4-Chloroindole-3-Acetic Acid	Ácido 4-cloroindol-3-acético
ABA	Absciscic acid	Ácido absícico
ACC deaminasa	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid deaminase	Desaminasa del Ácido 1- Aminociclopropano-1-Carboxílico
AHLs	<i>N-Acyl Homoserine Lactones</i>	<i>N</i> -acil-Homoserina-Lactonas
ANI	Average Nucleotide Identity	Identidad Nucleotídica Promedio
ANIm	ANI analysis using MUMmer3	ANI análisis usando MUMmer3
Aux	Auxins	Auxinas
CCD	Conserved Domain Database	Base de datos de dominios conservados
CCR	Carbon Catabolite Repression	Represión Catabólica de Carbono
CDS	Condng Sequence	Secuencias Codificantes
Ck	Cytokinins	Citocininas
COG	Clusters of Orthologous Groups	Grupo de Grupos Ortólogos
<b>Cq</b>	Quantification cycle	Ciclo de Cuantificación
DDH	DNA-DNA hybridization	Hibridación DNA-DNA
DNAe	Deoxyribonucleic acid (extracellular)	Ácido desoxirribonucleico extracelular
EPS	Exopolysaccharide	Exopolisacárido
Et	Ethylene	Etileno
Gb	Gibberellins	Giberelinas
IAA	Indole-3-Acetic Acid	Ácido Indol-3-Acético
IAAId	Indole-3-Acetaldehyde	Indol-3-Acetaldehído
IAM	Indole-3-Acetamide	Indol-3-Acetamida
IAOx	Indole-3-Acetaldoxime	Indol-3-Acetaldoxima
IBA	Indole-3- <i>Butyric</i> Acid	Ácido Indol-3-Butírico
IGP	Indole-3-Glycerol-Phosphate	Indol-3-Glicerolfosfato
IPA	Indole-3-Pyruvic Acid	Indol-3-Piruvato
IPDC	Indole-3-Pyruvic Acid Decarboxylase	Indol-3-Piruvato Descarboxilasa
ISR	Induced Systemic Resistance	Resistencia Sistémica Inducida
JA	Jasmonic acid	Ácido Jasmónico
L-Trp	L-Tryptophan	L-Triptófano
MIC	Minimum Inhibitory Concentration	Concentración Mínima Inhibitoria
NRP	Nonribosomal peptides (NRP)	Péptidos No Ribosomales
NTC	No Template Control	Control sin DNA molde
ORF	Open Reading Frames	Marco de Lectura Abierto
PAA	Phenylacetic Acid	Ácido Fenilacético
PDA	Potato Dextrose Agar	Agar Papa-Dextrosa
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria	Bacteria Promotora del Crecimiento Vegetal
PGPF	Plant Growth Promoting Fungi	Hongo Promotor del Crecimiento Vegetal

<b>Abreviatura por sus siglas en inglés</b>	<b>Significado en inglés</b>	<b>Significado en español</b>
PGPMs	Plant Growth Promoting Microorganisms	Microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria	Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal
Phr	Phosphatase-Regulator (Phr) Peptide	Péptido Regulador de Fosfatasa
PIP	Plant-Incorporated Protectants	Protectores Incorporados a las Plantas
PK	Polyketide	Policétidos
PKS	Polyketide synthase	Policétido Sintasa
QQ	<i>Quorum quenching</i>	<i>Quorum quenching</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>	<i>Quorum sensing</i>
Rap	Aspartyl-Phosphate Phosphatase	Aspartil-Fosfato Fosfatasa
RR	Response Regulator	Regulador de Respuesta
SA	Salicylic Acid	Ácido Salicílico
SAR	Systemic Acquired Resistance	Resistencia Sistémica Adquirida
TAM	Tryptamine	Triptamina
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
VIC	Volatile Inorganic Compounds	Compuestos Inorgánicos Volátiles
VOC	Volatile Organic Compounds	Compuestos Volátiles Orgánicos
YPG	Yeast Peptone Glucose	Extracto de Levadura-Peptona Glucosa
$\gamma$ -PGA	$\gamma$ -Poly-Glutamic Acid	Ácido Poli- $\gamma$ -Glutámico

**Abreviatura por sus siglas en español**

<b>Abreviatura por sus siglas en español</b>	<b>Significado en español</b>
aa	Aminoácidos
ACB	Agente de Control Biológico
DD	Días de Desarrollo
E	Eficiencia de amplificación
PM	Peso Molecular

# INDICE

ABREVIATURAS .....	5
INDICE DE TABLAS .....	9
INDICE DE FIGURAS .....	10
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
2.1. El género <i>Bacillus</i> .....	17
2.2. Formación de biopelícula .....	18
2.3. Esporulación.....	23
2.4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	24
2.5. Grupo operacional <i>B. amyloliquefaciens</i> como promotores del crecimiento y agentes de control biológico.....	26
2.6. Fungifree AB®: biofungicida contra fitopatógenos foliares y como promotor del crecimiento de plantas 39	
<b>3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>43</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
7.1. Caracterización genotípica y fenotípica de <i>B. subtilis</i> 83.....	45
7.1.1. Análisis del genoma de <i>B. subtilis</i> 83 e identificación de genes relacionados con control biológico y promoción del crecimiento vegetal .....	45
7.1.2. Diferencias fenotípicas entre <i>B. subtilis</i> 83 y <i>B. velezensis</i> FZB42 con respecto a la producción de metabolitos relacionados con la actividad de control biológico y promoción del crecimiento....	46
7.2. Ensayos de control biológico de <i>B. subtilis</i> 83 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	47
7.2.1. Preparación de los formulados con los factores de antagonismo de <i>B. subtilis</i> 83 .....	47

7.2.2. Eficacia de <i>B. subtilis</i> 83 en el control biológico de <i>C. gloeosporioides</i> en ensayos <i>in vivo</i> (cultivo de mango)	48
7.2.3. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> con <i>C. gloeosporioides</i>	49
7.2.4. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> con <i>B. cinerea</i>	51
7.2.5. Ensayos de control biológico <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> en hojas de jitomate	52
7.2.6. Ensayos de control biológico <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i> en frutos de jitomate	53
7.3. Promoción del crecimiento en jitomate: ensayos en laboratorio y ensayos en invernadero	54
7.3.1. Ensayo en laboratorio para evaluar el potencial como promotor del crecimiento de plantas que ejerce Fungifree AB®	54
7.3.2. Detección de UFC de <i>B. subtilis</i> 83 en plántulas de <i>A. thaliana</i>	54
7.3.3. Ensayo en invernadero	56
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>58</b>
8.1. Análisis del genoma de <i>B. subtilis</i> 83 y diferencias fenotípicas con <i>B. velezensis</i> FZB42 (modelo de control biológico y como PGPR)	58
8.2. Eficacia de <i>B. velezensis</i> 83 en el control biológico de <i>C. gloeosporioides</i> en ensayos <i>in vivo</i> (cultivo de mango)	63
8.2.1. Estudio de los factores de antagonismo de <i>B. velezensis</i> 83 vs <i>C. gloeosporioides</i> en ensayos <i>in vitro</i> (medio PDA)	64
8.2.2. Estudio de los factores de antagonismo de <i>B. velezensis</i> 83 vs <i>B. cinerea</i> en ensayos <i>in vitro</i> (en medio PDA, con hojas y con frutos de jitomate)	66
8.2.3. Efecto promotor de crecimiento que ejerce <i>B. velezensis</i> 83 al aplicarla en diferentes concentraciones y en diferentes estados fenológicos del cultivo de jitomate (semilla, plántula, crecimiento vegetativo de la planta cultivada en invernadero)	70
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>77</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	<b>77</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>96</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Proteínas Rap-Phr identificadas en el género <i>Bacillus</i> . .....	<b>22</b>
<b>Tabla 2.</b> Equivalencia entre especies según el análisis ANI (Ciufu <i>et al.</i> , 2018). .....	<b>25</b>
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las bacteriocinas producidas por el género <i>Bacillus</i> (Caulier <i>et al.</i> , 2019). .....	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b> Principales clases de policétidos producidos por el género <i>Bacillus</i> (Caulier <i>et al.</i> , 2019). .....	<b>30</b>
<b>Tabla 5.</b> Principales familias de NRP (Caulier <i>et al.</i> , 2019). .....	<b>30</b>
<b>Tabla 6.</b> Ejemplos de VOC producidos por cepas de <i>Bacillus</i> . .....	<b>32</b>
<b>Tabla 7.</b> Productos a base de cepas del grupo de <i>Bacillus</i> comercialmente disponibles (Keswani <i>et al.</i> , 2020). .....	<b>34</b>
<b>Tabla 8.</b> Tratamientos evaluados en el ensayo de control biológico contra antracnosis en mango. ....	<b>48</b>
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos con diferentes formulaciones de <i>B. subtilis</i> 83 contra <i>C. gloeosporioides</i> para ensayos de inhibición <i>in vitro</i> . .....	<b>50</b>
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos con diferentes formulaciones de <i>B. subtilis</i> 83 contra <i>B. cinerea</i> . .....	<b>51</b>
<b>Tabla 11.</b> Tratamientos usados en plantas de jitomate crecidas en invernadero. ....	<b>57</b>
<b>Tabla 12.</b> Genes para la síntesis de metabolitos relacionados con la actividad de control biológico e interacción con plantas identificados en <i>B. velezensis</i> 83. ....	<b>59</b>
<b>Tabla 13.</b> Severidad y eficacia del control biológico de <i>B. velezensis</i> 83 en frutos de mango post-cosecha. ....	<b>63</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general de la estructura de la biopelícula de <i>B. subtilis</i> . .....	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema general de las diferentes vías genéticas coordinadas por Spo0A, ComA y Deg U para la diferenciación celular y formación de biopelícula en <i>B. subtilis</i> (adaptado de López et al., 2008; Rhaman et al., 2021).....	<b>20</b>
<b>Figura 3.</b> Principales eventos que cambiaron la taxonomía del grupo <i>Bacillus subtilis</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 4.</b> Vías de síntesis de auxinas presentes en bacterias Gram-positivas (Keswani et al., 2020).....	<b>28</b>
<b>Figura 5.</b> Ensayo de inhibición con diferentes formulaciones de <i>B. subtilis</i> 83 en modo preventivo contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 6.</b> Ensayo de inhibición con diferentes formulaciones de <i>B. subtilis</i> 83 en modo curativo contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 7.</b> Ensayo de inhibición con diferentes formulaciones de <i>B. subtilis</i> 83 en modo curativo contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 8.</b> Ensayos de control biológico <i>in vitro</i> de <i>B. subtilis</i> 83 contra <i>B. cinerea</i> en hojas de jitomate. ....	<b>52</b>
<b>Figura 9.</b> Ensayos de control biológico <i>in vitro</i> de <i>B. subtilis</i> 83 contra <i>B. cinerea</i> en frutos de jitomate. ....	<b>53</b>
<b>Figura 10.</b> Producción de metabolitos de <i>B. velezensis</i> 83 y FZB42 asociados a la actividad de control biológico y de promoción del crecimiento de las plantas. ....	<b>62</b>
<b>Figura 11.</b> Eficacia (%) de inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> (en medio PDA) de <i>C. gloeosporioides</i> ATCC MYA 456 confrontado a los diferentes factores de antagonismo de <i>B. velezensis</i> 83. ....	<b>65</b>
<b>Figura 12.</b> Eficacia (%) de inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> (en medio PDA) de <i>B. cinerea</i> confrontado a los diferentes factores de antagonismo de <i>B. velezensis</i> 83 en modo preventivo.....	<b>66</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto del tratamiento de control biológico de <i>B. velezensis</i> 83 contra <i>B. cinerea</i> aplicado de modo preventivo... ..	<b>67</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto de la aplicación de <i>B. velezensis</i> 83 al sustrato de plántulas jitomate variedad Frodo.. ....	<b>72</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto de los tratamientos de <i>B. velezensis</i> 83 en la productividad del cultivo de jitomate en invernadero. ....	<b>75</b>

## RESUMEN

La especie *Bacillus velezensis* agrupa a cepas de bacterias que tienen la capacidad de establecer relaciones benéficas con las plantas debido a que son buenas colonizadoras de las plantas y producen compuestos que estimulan su crecimiento (son conocidas como *Plant Growth Promoting Bacteria*, PGPB) y también porque producen metabolitos antimicrobianos que protegen a las plantas de la invasión por fitopatógenos (ejercen control biológico). Fungifree AB<sup>®</sup>, es un biofungicida de aplicación foliar que es efectivo para el control biológico de hongos fitopatógenos que infectan cultivos de importancia agrícola. El principio activo de Fungifree AB<sup>®</sup> es una cepa bacteriana que fue inicialmente clasificada (por análisis del DNAr 16S) como *Bacillus subtilis*. Desde el 2015 se conoce la secuencia del genoma completo de *B. subtilis* 83, sin embargo, siguiendo la clasificación taxonómica actual, esta cepa pertenece a la especie *B. velezensis*. Por lo tanto, además de su uso como agente de control biológico (ACB), *B. subtilis* 83 tiene el potencial de actuar como PGPB. Debido a las características del proceso de producción de Fungifree AB<sup>®</sup>, el formulado contiene dos factores de antagonismo de *B. subtilis* 83 que son: 1) esporas (que al germinar serán células vegetativas activas como ACB o PGPB) y 2) metabolitos (producidos durante el cultivo de la bacteria). Saber cuál es el factor de antagonismo que tiene el principal efecto de control biológico es determinante para poder implementar, de una manera racional, mejoras al proceso de producción y formulación del producto comercial. En este trabajo se realizó la caracterización genética y fenotípica del principio activo de Fungifree AB<sup>®</sup>. A través de ensayos *in vivo* e *in vitro* se evaluó la eficacia biológica de los factores de antagonismo contenidos en Fungifree AB<sup>®</sup> contra dos hongos fitopatógenos foliares que afectan el cultivo de mango y de jitomate. Finalmente, con ensayos *in vivo* se evaluó el potencial de Fungifree AB<sup>®</sup> como PGPB para jitomate cultivadas en invernadero. A través de un análisis de Identidad Nucleotídica Promedio (ANI) se encontró que el genoma de *B. subtilis* 83 está estrechamente relacionado con la especie *B. velezensis* (ANI > 97%) y que tiene identidad genómica del 98% con *B. velezensis* FZB42 (cepa referencia como PGPB y ACB). Por lo tanto, *B. subtilis* 83 fue reclasificada como *B. velezensis* 83. El análisis del genoma de *B. velezensis* 83 indicó que la cepa posee los genes para producir metabolitos que son determinantes para la interacción bacteria-planta, esporulación, actividad como ACB y PGPB. Se encontraron diferencias fenotípicas importantes entre *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42 como lo es la producción de metabolitos asociados con la actividad como ACB, no obstante, la alta identidad genómica entre las cepas. *B. velezensis* 83 controló antracnosis en mangos Kent con la misma eficacia que los productos químicos Captan 50 PH<sup>®</sup> o Cupravit hidro<sup>®</sup>. Se concluyó que en medios ricos en nutrientes (medio PDA y frutos de jitomate), las esporas de *B. velezensis* 83 contenidas en Fungifree AB<sup>®</sup>, fueron el principal factor de antagonismo que contribuyó en la eficacia de control biológico contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*. En medios limitados de nutrientes (p. ej. la superficie de las hojas), los metabolitos (sintetizados durante el cultivo de la bacteria: p. ej. surfactina, enzimas, sideróforo, nutrientes residuales, moléculas de *Quorum sensing*) incluidos en la formulación contribuyeron con las células en la eficacia del producto Fungifree AB<sup>®</sup>. A partir de datos registrados de la cosecha de jitomate cultivado en invernadero con Fungifree AB<sup>®</sup> aplicado como tratamiento biológico al sustrato y al follaje de las plantas, se encontró que se logró obtener una productividad de 4.5 Kg de jitomate por planta y el 63% de la cosecha fue fruto de 1ª calidad. Se estimó que con ese tratamiento el rendimiento del cultivo fue de a 254 T/ha-año, lo cual representó un incremento de ~41% del rendimiento promedio reportado en México. Estos resultados permitieron concluir que bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo *B. velezensis* 83 tuvo la capacidad de ser PGPB para plantas de jitomate. Finalmente, se estimó que la rentabilidad de ese tratamiento biológico con Fungifree AB<sup>®</sup> fue 2 veces mayor que la de un testigo comercial.



## ABSTRACT

*Bacillus velezensis* strains are characterized by grouping bacteria that have the ability to establish beneficial relationships with plants as they are good colonizers and produce compounds that stimulate plant growth. Therefore, they are known as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB); besides they produce antimicrobial metabolites which protect plants from invasion by phytopathogens acting as Biological Control Agents (BCA). Fungifree AB<sup>®</sup>, is a biofungicide effective for the control of phytopathogenic fungi infecting crops of agricultural importance, the active ingredient of this product is a bacterial strain initially classified, through 16S ribosomal analysis, as *B. subtilis* strain 83. The genome sequence of *B. subtilis* 83 was completed since 2005; however, following the current taxonomic criteria, this strain was reclassified as a *B. velezensis* specie. Being the Fungifree AB<sup>®</sup> formulated with the strain *B. velezensis* 83, in addition to its properties as a BCA, it also has the potential to act as a PGPB. Therefore, in addition to its use as a BCA, *B. subtilis* 83 has the potential to act as PGPB.

Due to the characteristics of the production process of Fungifree AB<sup>®</sup>, the formulation contains two antagonism factors of *B. subtilis* 83 which are: 1) spores (which, when germinating, will be active vegetative cells such as BCA or PGPB), and 2) metabolites (that are produced during the cultivation of the bacteria). Knowing which is the antagonism factor that has the main effect of biological control is to determine to be able to implement, in a rational way, improvements to the production process and formulation of the commercial product. In this work, the geno and phenotypic characterization of the active principle of Fungifree AB<sup>®</sup> (*B. subtilis* 83) was carried out, through *in vivo* and *in vitro* tests the biological efficacy of the antagonism factors contained in Fungifree AB<sup>®</sup> against two foliar phytopathogenic fungi that affect mango and tomato crops was evaluated, and finally with *in vivo* tests the potential of Fungifree AB<sup>®</sup> as a growth promoter in tomato plants was also evaluated.

Whole genome comparison between *B. subtilis* 83 and other *Bacillus* species using Average Nucleotide Identity (ANI), indicated that the genome of the bacterium is closely related to the species *B. velezensis* (ANI > 97%), and that it has 98% genomic identity with *B. velezensis* FZB42 (reference strain as PGPB and ACB). Therefore, *B. subtilis* 83 was reclassified as *B. velezensis* 83. *B. velezensis* 83 was found to have the genes to produce numerous metabolites that are determinant for bacteria-plant interaction, sporulation, biological control, and PGPB-like activity. Important phenotypic differences were found between *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42, such as the production of metabolites associated with biological control activity, notwithstanding the high genomic identity between these strains. *B. velezensis* 83 controlled anthracnose on Kent mangoes with the same efficacy as the chemicals Captan 50 PH<sup>®</sup> or Cupravit hydro<sup>®</sup>. It was concluded that in media rich in nutrients (PDA medium and tomato fruits), the spores of *B. velezensis* 83 contained in Fungifree AB<sup>®</sup>, were the main factor of antagonism that contributed to the efficacy of biological control against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea*. . In nutrient-limited media (*i.e.* leaf surfaces), metabolites contributed to the cells' efficacy of the Fungifree AB<sup>®</sup> product. Fungifree AB<sup>®</sup> was applied as a biological treatment to the substrate and foliage of the plants, with this treatment the productivity was of 4.5 kg of tomato per plant and 63% of the harvest was fruit of 1st quality. It was estimated that with this treatment the crop yield was 254 T/ha-year, which represented an increase of almost 43% of the average yield reported in México. In conclusion *B. velezensis* 83 had the capacity to be PGPB for tomato plants. Finally, it was estimated that the profitability of this biological treatment with Fungifree AB<sup>®</sup> was 2 times higher than a commercial control.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Bacillus* es un género de bacterias que se caracteriza por contener varias especies que de forma directa o indirecta establecen relaciones benéficas con las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017; Borriss, 2016). A través de mecanismos directos algunas cepas de *Bacillus* promueven el crecimiento vegetal debido a que mejoran la adquisición de nutrientes como el nitrógeno y el fosfato, también a través de la producción de fitohormonas tales como el ácido indol acético (IAA), enzimas como la ACC deaminasa o compuestos volátiles orgánicos (VOC) como el 2,3-butanodiol y la acetoína (Hanif *et al.*, 2015; Asari *et al.*, 2016, 2017). Por otro lado, a través de mecanismos indirectos, debido a la producción de compuestos antimicrobianos como los lipopéptidos y los policétidos, algunas cepas de *Bacillus* ejercen control biológico mediante un mecanismo de antibiosis sobre varias especies de bacterias y hongos fitopatógenas como *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oxonopodis*, *Erwinia amylovora*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* y *Penicillium expansum* (Fira *et al.*, 2018). Los mecanismos de control biológico de *Bacillus* spp. también involucran competencia por espacio-nutrientes y en algunos casos la resistencia sistémica inducida (ISR) en la planta. De esta forma, debido la interacción de los tres diferentes mecanismos de control biológico de *Bacillus* spp. sobre los fitopatógenos, la incidencia y/o severidad de enfermedades en plantas puede ser disminuida (Fan *et al.*, 2018). Asimismo, *Bacillus* spp. forman esporas con alta resistencia a la deshidratación y al calor, lo cual las hace excelentes candidatos para formular bioproductos (Dunlap *et al.*, 2019).

Actualmente, las esporas de la cepa *B. subtilis* 83 son comercializadas en México como Fungifree AB® (polvo humectable de aplicación foliar y la recomendación de uso para el control de para antracnosis del mango es aplicar 2 g/L de Fungifree AB® en intervalos de 60 días desde el inicio de la floración hasta la cosecha del fruto (<https://www.fmcagroquimica.com.mx/wp-content/uploads/2018/06/Fungifree-AB-Ficha-T%C3%A9cnica.pdf>). Se sabe que Fungifree AB® es efectivo para el control biológico de cinco diferentes géneros de hongos fitopatógenos (*Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca* y *Leveillula*) los cuales infectan cultivos de importancia agrícola como mango, aguacate, papaya, cítricos, jitomate, fresa, arándano, zarzamora y cucurbitáceas (Galindo *et al.*, 2005). Fungifree AB® es un desarrollo tecnológico del Instituto de Biotecnología-UNAM en colaboración con el CIAD Unidad Culiacán (Galindo *et al.*, 2005; Serrano-Carreón *et al.*, 2007; Galindo *et al.*, 2013). Debido a las características del proceso de producción de Fungifree AB®, el formulado contiene dos factores de antagonismo que son: 1) esporas (que al germinar serán células vegetativas) y 2) metabolitos (producidos durante el cultivo de la bacteria).

En la línea de investigación del Dr. Enrique Galindo y Dr. Leobardo-Serrano, existe el interés de entender si el efecto principal de la eficacia del producto es debido a la actividad *in situ* de la bacteria (competencia de las células por espacio-nutrientes, antibiosis a través la síntesis *de novo* de antibióticos y probablemente por elicitar la ISR) o bien por los metabolitos (por su actividad como antibióticos y/o como elicitores de ISR) que van incluidos en la formulación comercial. Saber cuál es el factor de antagonismo que tiene el principal efecto de control biológico es determinante para poder implementar, de una manera racional, mejoras al proceso de producción y formulación del producto comercial. Por ejemplo, si las esporas tuvieran el principal efecto, esto implicaría que solo debe ser recuperada la biomasa y el sobrenadante del cultivo debe ser desechado, lo cual representa una considerable reducción de tiempos de secado por aspersión que se realizan en el proceso de formulación. En caso

de que los metabolitos tuvieran el principal efecto, permitía entender cómo es que Fungifree AB® ejerce el control biológico con los metabolitos incluidos en la formulación mientras las esporas germinan y dan lugar a las células vegetativas que continuarán con la actividad de control biológico. También existe el interés de saber si *B. subtilis* 83 tiene el potencial de promover el crecimiento de plantas. La secuenciación del genoma completo de *B. subtilis* 83, permitió considerar que está estrechamente relacionada con *B. velezensis* FZB42, así como el potencial de control biológico y promoción del crecimiento de plantas que tiene *B. subtilis* 83. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron el realizar la caracterización genética y fenotípica de *B. subtilis* 83, evaluar a esta cepa como ACB (interacciones *B. subtilis* 83-patógeno-planta) y como promotor de crecimiento (interacciones *B. subtilis* 83-planta) a través de ensayos *in vivo* e *in vitro*. Para el desarrollo de este proyecto fueron seleccionados dos patosistemas en los cuales el uso del fungicida está autorizado para su uso en México: la antracnosis (*C. gloeosporioides*) que afecta al mango y el moho gris (*B. cinerea*) que afecta al jitomate.

## 2. ANTECEDENTES

Existe una gran cantidad de microorganismos (bacterias, hongos, protistas, algas, virus y nemátodos) capaces de colonizar las plantas (microbiota) estableciendo relaciones que pueden ser benéficas, neutrales o patogénicas (Trivedi *et al.*, 2020). Debido sus actividades biológicas, cuando la relación microorganismo-planta es benéfica los microorganismos participan en uno o varios de los siguientes procesos (Trivedi *et al.*, 2020; Khatoon *et al.*, 2020):

**Biofertilización del suelo:** debido a que favorecen la disponibilidad de nutrientes para la planta.

**Bioestimulación:** debido a que estimulan el crecimiento de la planta.

**Bioprotección:** debido a la protección ante factores bióticos (son ACB) y abióticos (protección ante condiciones de estrés). Cuando funcionan como ACB son mejor conocidos como bioplaguicidas (Fenibo *et al.*, 2021) y se clasifican en plaguicidas microbiales, bioquímicos o protectores incorporados a las plantas (PIP).

**Bioremediación del suelo:** debido a que tienen la capacidad de degradar compuestos contaminantes que afectan las propiedades del suelo, por lo tanto, la salud y nutrición de la planta.

La importancia de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPMs) se debe a que incrementan la fertilidad del suelo, la producción agrícola, la calidad nutricional del producto agrícola y también mejoran el ecosistema porque disminuyen o evitan el uso de productos químicos para fertilización y/o participan como ACB (Abhilash *et al.*, 2016). Entre los géneros de bacterias más conocidos como PGPB encontramos a *Rhizobium*, *Frankia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Serratia* (Abhilash *et al.*, 2016; Gouda *et al.*, 2018; Khatoon *et al.*, 2020). Muchas de las cepas que han sido aisladas de la rizófera (rizobacterias) e identificadas y caracterizadas como promotoras del crecimiento vegetal son mejor conocidas como PGPR, actualmente se sabe que estimulan el crecimiento de la planta a través de mecanismos de acción directos e indirectos (Timmusk *et al.*, 2017; Basu *et al.*, 2021). Entre los géneros de hongos más conocidos como promotores del crecimiento vegetal (PGPF) encontramos a los géneros *Aspergillus*, *Piriformospora*, *Phoma*, *Penicillium*, *Sclerocystis*, *Trichoderma*, *Ganoderma*, *Beauveria* y *Glomus* (Abhilash *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2020).

El término PGPR se utiliza para bacterias que tienen la capacidad de colonizar las raíces (rizósfera) de las plantas y favorecer el crecimiento vegetal, por esta razón se han utilizado como ingredientes activos para productos biofertilizantes. Además de su efecto benéfico sobre la planta, también pueden ejercer control biológico de fitopatógenos (Vejan *et al.*, 2016). El uso de las PGPR ha sido propuesto como una estrategia para disminuir los efectos negativos que causan el estrés abiótico y biótico sobre las plantas y así incrementar la productividad de los cultivos agrícolas (Poveda *et al.*, 2021).

Una cepa PGPR “ideal” debe tener las siguientes características (Basu *et al.*, 2021):

- Altamente competente para establecerse en la rizósfera.
- Colonizar la raíz de la planta de manera significativa (en términos cuantitativos) después de su aplicación.
- Promover el crecimiento de la planta.

- Exhibir un amplio espectro de acción en términos de control biológico.
- Ser tolerante a factores fisicoquímicos como calor, desecación, radiación y antioxidantes.

A través de mecanismos directos las PGPR favorecen la nutrición y el crecimiento de la planta debido a que:

- Favorecen la disponibilidad de nutrientes para las plantas a través de mecanismos como la fijación de nitrógeno atmosférico o solubilización de nutrientes como hierro, fosfato, potasio o zinc, principalmente (Timmusk *et al.*, 2017).
- Producen hormonas (fitoestimulantes) como auxinas (Aux), etileno (Et), citocininas (Ck), giberelinas (Gb), ácido absícico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) (Tsukanova *et al.*, 2017) así como compuestos orgánicos volátiles (VOC).
- Promueven la resistencia de la planta a factores de estrés a través de desencadenar la producción de enzimas como la ACC desaminasa la cual degrada el precursor para la síntesis de la hormona Et. Se sabe que el Et está involucrado en diferentes procesos de crecimiento y desarrollo de la planta (Vejan *et al.*, 2016) y es conocido como la hormona del estrés ya que se produce como una respuesta a factores que afectan negativamente la salud de la planta como la inundación, sequía, salinidad, compuestos tóxicos, temperatura, entre otros) (Saraf *et al.*, 2010). Altas concentraciones de Et en la planta afectan la fijación de nitrógeno, elongación de las raíces y el proceso de la senescencia (Esquivel-Cote *et al.*, 2013).
- Favorecen la rizo-remediación (bioremediación) el cual es un proceso facilitado por el llamado “efecto rizósfera” en el cual la planta estimula la proliferación del microbioma que facilita la degradación o el metabolismo de compuestos contaminantes (xenobióticos) en el suelo (Alotaibi *et al.*, 2021; Naamala y Smith, 2021).

A través de mecanismos indirectos las PGPR participan además como ACB debido a que presentan antagonismo hacia otros microorganismos debido a:

- Competencia por espacio-nutrientes: a través de establecer biopelículas los microorganismos benéficos o de producir sideróforos (compuestos quelantes) evitan la proliferación de microorganismos fitopatógenos.
- Producción de compuestos antimicrobiales (antibiosis).
- ISR de la planta contra fitopatógenos.

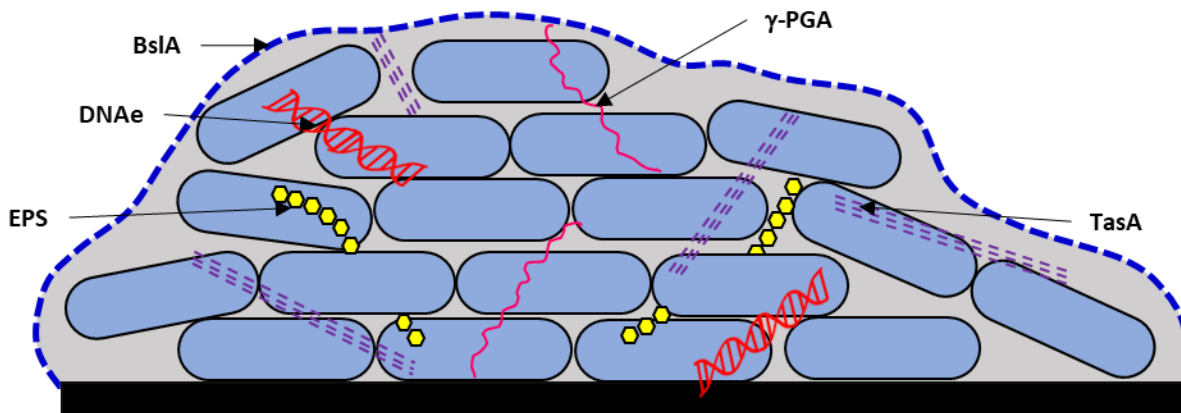
Debido a las propiedades anteriormente descritas, varias cepas de microorganismos benéficos han sido propuestas (y actualmente ya son comercializadas) como una alternativa para lograr sistemas de producción basados en técnicas de agricultura sustentable (Basu *et al.*, 2021). Entre ellos, varios de los productos comercialmente disponibles son formulados con cepas del género *Bacillus* y han sido utilizadas como PGPR así como ACB, aprovechando su cualidad de formar esporas con alta resistencia a la deshidratación y al calor, lo cual las hace excelentes candidatos para formular bioproductos (Dunlap *et al.*, 2019).

## 2.1. El género *Bacillus*

Las células vegetativas de las especies al género *Bacillus* tienen forma de bastón, son bacterias Gram-positivas, con tamaño entre 0.4 a 1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.9 a 10.0  $\mu\text{m}$  de longitud. Durante la fase de crecimiento las células pueden formar cadenas de diferente longitud, durante la fase final del crecimiento exponencial pueden ser móviles y accesibles a bacteriófagos. Forman endosporas que son muy resistentes a condiciones fisicoquímicas desfavorables (alta temperatura, radiación UV y sustancias químicas) y nutricionales adversas (Borriss *et al.*, 2020). Dentro del género *Bacillus* se agrupan 377 especies y 8 subespecies, en ambos casos incluyendo nombres sinónimos (<https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>). Los nombres sinónimos son nombres que en su momento fueron aceptados pero que actualmente son nombres incorrectos debido al surgimiento de técnicas de análisis genómico que son más precisas. Dentro de la familia Bacillaceae el género tipo es *Bacillus*, la especie tipo de este género es *Bacillus subtilis* y la cepa tipo de esta especie es la *B. subtilis* 168. Gran parte del conocimiento respecto a la especie *B. subtilis* ha sido generado utilizando a la cepa *B. subtilis* 168 como modelo de estudio (Losick 2020; Gallegos-Monterrosas *et al.*, 2021). *B. subtilis* es una bacteria móvil, tiene flagelos rotatorios con los cuales la célula puede “nadar” (movimiento tipo *swimming*) en medio líquido. En determinadas condiciones, las células móviles pueden pasar a un estado sésil a través de formar cadenas conformadas por células individuales. Se ha argumentado que las células sésiles producen compuestos (para formar una matriz extracelular) que le permiten adherirse a la superficie y formar una biopelícula para obtener los recursos de un nicho y que las células móviles se desplazan para explorar nuevos nichos. También se sabe que las células de *B. subtilis* presentan un tipo de movimiento similar al de un enjambre (conocido como *swarming*) y que de esta forma superan la tensión superficial de la superficie a través de tres mecanismos: 1) movimiento en grupo, 2) más flagelos en la célula y 3) producción de un compuesto tensoactivo (el lipopéptido surfactina). Otro tipo de movimiento que ha sido observado en superficies semisólidas (p. ej. agar) es el conocido como *sliding*, en el cual el movimiento es facilitado por una proteína que le confiere hidrofobicidad a la biopelícula y un exopolisacárido componente estructural de la matriz extracelular, que lubrican la superficie para facilitar el desplazamiento de las células (Losick, 2020). *B. subtilis* es una bacteria que presenta competencia genética, que es un estado fisiológico transitorio a través del cual las células de *B. subtilis* de manera natural se convierten en células transformables (que adquieren DNA exógeno) (Hamoen *et al.*, 2003; Rahmer *et al.*, 2015). Se sabe que solo una parte de la población (<1%) de una colonia puede presentar competencia al entrar a la fase estacionaria de crecimiento (Brito *et al.*, 2018). Se ha argumentado que a través de la competencia genética la célula de *B. subtilis* adquiere DNA templado (patrón, molde) que es utilizado para reparación del DNA, asimismo que es un mecanismo de defensa contra parásitos genómicos, facilita la adquisición de nucleótidos y finalmente favorece la variabilidad genética, se sugiere que con esta estrategia celular *B. subtilis* puede adaptarse y habitar diferentes nichos (Brito *et al.*, 2018). Son habitantes del suelo, ambientes acuólicas, alimentos, son microbiota intestinal de artrópodos y mamíferos. Son bacterias mesófilas (20-30 °C) y crecen a pH entre 6-7 (Borriss *et al.*, 2020). Debido a la variedad de metabolitos que producen, son de importancia industrial ya que se les ha encontrado aplicación en las áreas ambiental, agrícola, alimentos y farmacéutica (Caulier *et al.*, 2019).

## 2.2. Formación de biopelícula

Una más de las características de interés, es la capacidad de las cepas de *Bacillus* para formar biopelículas. La formación de la biopelícula es esencial para que las cepas de *Bacillus* colonicen a la planta y para lograr la protección de la infección por fitopatógenos (Allard-Massicotte *et al.*, 2016). Hasta la fecha mucho del conocimiento ha sido generado a partir de la investigación realizada con la especie *B. subtilis* y en particular con la cepa *B. subtilis* 168 (Gallegos-Monterrosas *et al.*, 2016). La biopelícula que forma *B. subtilis* es una comunidad multicelular y puede ser visible tanto en medios sólidos como en líquidos. En *B. subtilis* la biopelícula exhibe un aspecto arrugado, que se piensa es una estrategia de la colonia para maximizar el acceso al oxígeno a través de aumentar la relación superficie:volumen de la estructura multicelular (Losick, 2020). Se argumenta que la biopelícula de *B. subtilis* es una comunidad que simula un cuerpo fructífero y que está compuesto por tres diferentes tipos celulares: células móviles, células productoras de matriz extracelular y células formadoras de endosporas, que están distribuidos en la parte baja, media y alta de la colonia, respectivamente (Losick, 2020). Las células dentro de la biopelícula se mantienen unidas debido a la producción de la matriz extracelular, la cual está compuesta por exopolisacárido (EPS), proteínas (TasA y BslA), DNA extracelular (DNAe) y ácido poli-glutámico ( $\gamma$ -PGA) (Arnaouteli *et al.*, 2021; Mohsin *et al.*, 2021). La Figura 1 (tomado de Arnaouteli *et al.*, 2021) muestra el esquema general de la estructura de la biopelícula que forma *B. subtilis*.



**Figura 1.** Esquema general de la estructura de la biopelícula de *B. subtilis*.

El EPS es el principal carbohidrato componente de la biopelícula, su síntesis es dependiente de los productos del operón *epsA-O* (*epsA*, *epsB*, *epsC*, *epsD*, *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsH*, *epsI*, *epsJ*, *epsK*, *epsL*, *epsM*, *epsN* y *epsO*) la cual es llevada a cabo principalmente por células que están en la periferia de la colonia (Arnaouteli *et al.*, 2021). Se sabe que el EPS controla su vía de síntesis funcionando como molécula de señalización (Elsholz *et al.*, 2014). Los productos de los genes *epsA* y *epsB* son proteínas que conforman un sistema de dos componentes para activar la vía de síntesis del EPS. El EPS es sentido por el dominio extracelular de la proteína moduladora EpsA (proteína transmembranal) y a través de su dominio citoplasmático activa a la tirosina-cinasa EpsB, la cual se autofosforila y transfiere el grupo fosfato al producto del gen *epsE*, la proteína EpsE. EpsE es una glicosiltransferasa que en estado fosforilado desencadena el sistema de síntesis del EPS. Alta concentración de EPS inhibe la autofosforilación de EpsB evitándose así la activación de EpsE y la subsecuente síntesis de EPS (Elsholz *et al.*, 2014).

Los productos de *epsL*, *epsD*, *epsF*, *epsH* y *epsJ* son también glicosiltransferasas. El *epsL* codifica a la proteína EpsL, la cual transfiere moléculas de UDP-glucosa o UDP-galactosa a lípidos acarreadores, mientras que EpsD transporta el ácido UDP-glucurónico. Los genes *epsE* y *epsF* codifican proteínas que transportan UDP-Glc. Los genes *epsH* y *epsJ* codifican para proteínas transportadoras de amino-azúcares. El gen *epsG* codifica la proteína EpG la cual polimeriza las unidades de carbohidrato que conformarán el EPS. El producto de *epsK* es una proteína que transporta el polisacárido al espacio periplásmico. Las proteínas codificadas en *epsC*, *epsI*, *epsO*, *epsM* y *epsN* están involucradas en la modificación del polisacárido (Elsholz *et al.*, 2014; Arnaouteli *et al.*, 2021; Vu *et al.*, 2021). El EPS además de funcionar como un componente que le da complejidad a la estructura de la biopelícula, favorece la retención de agua en la biopelícula (lo cual protege a las células del estrés hídrico) y la agregación del suelo (Vardharajula y Ali, 2014). Vardharajula y Ali (2014), reportaron que las cepas *B. amyloliquefaciens* HYD-B17; *B. licheniformis* HYTAPB18 y *B. subtilis* RMPB44 incrementaron entre 5-14 veces la concentración de EPS al incrementar el estrés hídrico del medio de cultivo con potencial hídrico ( $\psi$ ) desde -0.05 a -0.73 MPa. Por otra parte, se encontró que el EPS que esas tres cepas sintetizaron fue un heteropolímero que estuvo constituido principalmente por glucosa, rafinosa y por ácido glucurónico, observándose que la proporción de los carbohidratos fue dependiente de la cepa y de la condición de  $\psi$  a la que fueron sometidas (Vardharajula y Ali, 2014). Otros autores (Moghannem *et al.*, 2018; Vu *et al.*, 2021) han reportado que el tipo y concentración de fuente de carbono y nitrógeno, así como la temperatura y tiempo de incubación, fueron determinantes en la productividad y composición del EPS que producen las cepas de *Bacillus*. Otro EPS sintetizado por cepas de la especie *B. amyloliquefaciens* (Gu *et al.*, 2017) y *B. velezensis* (Vu *et al.*, 2021) es la levana. La levana es un homopolímero de fructosa que solo es sintetizado a partir de sacarosa como fuente de carbono y debido a la actividad extracelular de la enzima levanasacarosa (producto del gen *ls*) en cepas de *B. velezensis* (Vu *et al.*, 2021).

El operon *tapA* codifica tres proteínas que forman parte de la biopelícula de *B. subtilis*: TapA, SipW y TasA. TapA es una proteína de 253 residuos con multidominios que contiene un péptido señal de 43 aminoácidos (aa). TapA ha sido descrita al igual que TasA como una proteína de ensamble y de anclaje. SipW es una peptidasa señal tipo I que modifica post-traduccionalmente a TasA y TapA por cortar el péptido señal N-terminal de la superficie extracelular. Adicionalmente, el dominio citoplasmático C-terminal de SipW activa la expresión de los operones *epsA-O* y *tapA* en la biopelícula, así que se considera que tiene un papel esencial en la formación de la biopelícula.

TasA tiene varias funciones, es el principal componente proteico de la estructura de la biopelícula, facilita la motilidad de la colonia tipo *sliding* así como la señalización, además de la colonización de la planta. TasA es una proteína de 261 (aa) con un péptido señal de 27 residuos, que además de su papel estructural en la biopelícula (Arnaouteli *et al.*, 2021), contribuye con la fluidez y estabilidad de la membrana celular regulando varios procesos dinámicos en la membrana celular, lo cual repercute en la viabilidad celular dentro de la colonia y el desempeño de *B. subtilis* en el filoplano (Cámara-Almirón *et al.*, 2020).

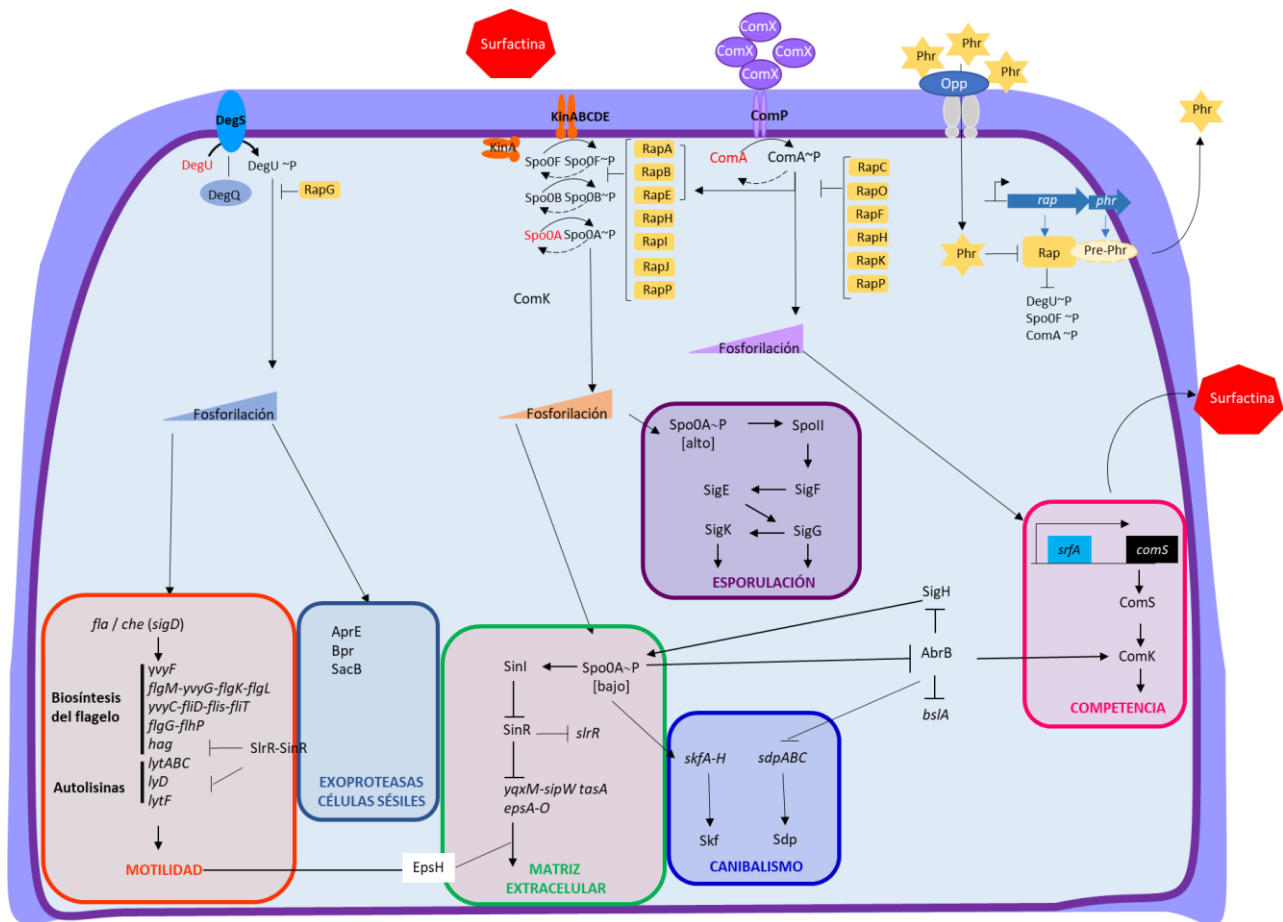
La proteína BslA además de ser componente estructural de la biopelícula, le confiere propiedades de hidrofobicidad. Se sabe que el DNAe interacciona con el EPS y que da como resultado la estructura 3D a la biopelícula (Peng *et al.*, 2020).

El  $\gamma$ -PGA es un polímero aniónico lineal de L-glutamato y D-glutamato unidos por el extremo  $\gamma$ -carboxil, la síntesis de este compuesto es dependiente de enzimas codificadas por el operón *pgsBCAE* (anteriormente conocido como *ywtC-yetABC*): PgsB y PgsC son responsables de la polimerización, PgsA y PgsE forman la maquinaria de



exportación del polímero. La función del  $\gamma$ -PGA está relacionado con la retención de agua y protección a la deshidratación.

La capacidad de formar la biopelícula en la raíz de la planta, permite que se establezca la relación benéfica microorganismo-planta promoviendo la salud y el crecimiento de la planta (Losick, 2020). La formación de biopelícula es inducida por condiciones ambientales (p. ej. disponibilidad de nutrientes) que rodean a las células, es un proceso cooperativo, altamente complejo y estrictamente regulado (Kalamara *et al.*, 2018). Se ha descrito que la formación de biopelícula en la raíz de la planta, comienza una vez que las células alcanzan la raíz, iniciando con el cambio del estado de células independientes móviles a células formadoras de biopelícula y que el proceso está regulado por la vía de Spo0A (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema general de las diferentes vías genéticas coordinadas por *Spo0A*, *ComA* y *DegU* para la diferenciación celular y formación de biopelícula en *B. subtilis* (adaptado de López *et al.*, 2008; Rhaman *et al.*, 2021).

El primer suceso es el reconocimiento de las señales de la planta a través de la participación de las cinasas KinCD, resultando en una cascada de fosforilación (~P) que involucra a Spo0F, Spo0B y eventualmente Spo0A. Con baja concentración Spo0A~P se induce la producción de la proteína SinI, la cual es represora de SinR y lo cual resulta en la desrepresión del gen *slrR*. La proteína SlrR forma un complejo con SinR, manteniendo bajos niveles de SinR

libre y así la ocurre la desrepresión de los genes necesarios para la síntesis de la matriz (*yqxM-sipW tasA-epsA-O*). Adicionalmente, el complejo SlrR-SinR reprime la expresión de los genes de motilidad *hag* y los genes de autolisina *lytABC* y *lytF*, dando como resultado cadenas de células productoras de matriz. Finalmente, Spo0A~P inhibe a AbrB (un segundo represor de los genes de la matriz), también liberando la represión de los genes de la matriz. Sin embargo, se sabe que Spo0A no solo participa en la regulación de la formación de matriz (EPS, TasA, BslA, DNAe y  $\gamma$ -PGA), sino también en el proceso de esporulación, competencia genética, así como en la generación de células caníbales, así que son procesos biológicos estrechamente relacionados (López *et al.*, 2008; Blake *et al.*, 2021). Se sabe que la secreción de surfactina de manera indirecta causa la fosforilación de Spo0A y es así como Spo0A~P favorece la producción de matriz extracelular (Kalamara *et al.*, 2018).

En la formación de la biopelícula, adicionalmente a Spo0A, participan otros dos reguladores que son: DegU regulando el proceso de secreción de exoproteasas (y otras enzimas extracelulares) y ComA regulando el proceso de competencia genética y síntesis de surfactina (Blake *et al.*, 2021; Gallegos-Monterrosas *et al.*, 2021). Cada uno de estos reguladores (Spo0A, DegU y ComA) es fuertemente afectado por el *Quorum sensing* (QS: mecanismo biológico de comunicación célula-célula a través de la producción de moléculas de señalización) a través de los sistemas de señalización integrados por ComQXPA y Rap-Phr (Kalamara *et al.*, 2018; Gallegos-Monterrosas *et al.*, 2021) y así se regulan los procesos de competencia genética, esporulación y síntesis de metabolitos antimicrobianos (p. ej. surfactina).

ComX es un compuesto que tiene el papel de ser autoinductor (es una feromona) y ComP es una proteína cinasa sensora que forma parte del complejo de dos componentes ComP-ComA cuya actividad es ser un sistema de transducción de señales. ComA es una proteína cognado reguladora de respuesta ligadora de DNA. ComQ tiene la función de procesar, modificar y exportar a ComX y finalmente generar la señal madura del QS. La unión extracitoplasmática de ComX en el dominio receptor de ComP resulta en la fosforilación y activación de ComA en el citoplasma. ComA~P regula positivamente la producción del lipopéptido surfactina y directamente activa la producción de otros compuestos que son requeridos por la colonia a través de la regulación de la transcripción del gen *degQ* (Kalamara *et al.*, 2018). La proteína DegQ estabiliza la fosforilación de DegU, en ausencia de DegU la proteína DegQ favorece la defosforilación y autofosforilación de DegS (Do *et al.*, 2011).

DegS y DegU conforman un sistema de transducción de señales de dos componentes cuya función es regular la expresión de genes que participan en el proceso de competencia celular, la motilidad tipo *swarming*, formación de biopelícula y la síntesis de exoproteasas en *Bacillus subtilis* (Murray *et al.*, 2009). DegS es una proteína transmembranal con actividad histidina-cinasasa que fosforila a la proteína citoplasmática reguladora de respuesta DegU. La competencia celular de *B. subtilis* está asociada con DegU no fosforilado, concentración intermedia de DegU~P favorece la transcripción de genes para la formación de biopelícula (*eps* y *tasA*) y alta concentración de DegU~P activa la transcripción de genes para síntesis de exoproteasas (Msadek *et al.*, 1991; Verhamme *et al.*, 2007; Marlow *et al.*, 2014). Verhamme *et al.* (2007), encontraron que baja concentración de DegU~P activa la motilidad tipo *swarming* de manera independiente a la actividad de DegS. Baja concentración de DegU~P (dependiente de la actividad de DegS) activa la transcripción del gen *yvcA*, el cual es necesario para dar complejidad (p. ej. rugosidad y formación del cuerpo fructífero) a la estructura de la biopelícula. Marlow *et al.* (2014), reportaron que alta concentración de DegU~P inhibe la formación de biopelícula a través de reducir (de manera indirecta) la expresión de *epsA* y *tasA*, pero que activa la transcripción del gen *bslA*. Adicionalmente se ha

observado que alta concentración de DegU~P está asociado con alto porcentaje de esporulación en *B. subtilis* y se sabe que es debido a que incrementa la concentración de Spo0A~P en la célula. Así DegU es un factor de transcripción que regula la diferenciación celular dentro de la biopelícula (Marlow *et al.*, 2014).

Por otra parte, el sistema Rap-Phr también afecta la heterogeneidad de la población celular en la biopelícula, las Rap (aspartil-fosfato fosfatasas) son una familia de proteínas reguladoras de respuesta y sus cognados son los péptidos Phr (péptidos reguladores de fosfatasa) (Gallegos-Monterrosas *et al.*, 2021). Las proteínas Rap citoplasmáticas ejercen su función regulatoria a través de inhibir la actividad de su regulador blanco (Spo0F, DegU o ComA) vía desfosforilación o por directamente bloquear el sitio de unión a DNA. Las proteínas Rap son a su vez inhibidas por su péptido cognado, los cuales son producidos como pre-Phr proteínas que son exportadas al medio extracelular y cortadas para producir péptidos maduros (activos) de 5 a 6 aa. Los péptidos Phr son importados de regreso a la célula después de alcanzar el nivel umbral de alta concentración celular y unirse a su fosfatasa cognado Rap, induciendo los cambios conformacionales que inhiben su actividad (Gallegos-Monterrosas *et al.*, 2021). Dentro de la especie *B. subtilis* han sido identificadas 15 proteínas Rap y solo 12 péptidos Phr (Kalamara *et al.*, 2018). En la Tabla 1 (tomado de Kalamara *et al.*, 2018) se describen las proteínas Rap y los péptidos Phr presentes en el género *Bacillus*. Se sabe que las Rap regulan procesos dependientes de tres sistemas regulatorios: 1) DegS-DegU (competencia, motilidad y producción de exoproteasas), 2) cascada de fosforilación dominada por Spo0A (producción de matriz extracelular y esporulación) y 3) ComP-ComA (producción de surfactina y competencia genética) (Figura 2).

**Tabla 1.** Proteínas Rap-Phr identificadas en el género *Bacillus*.

Proteína Rap	Péptido Phr	Función biológica
RapA	PhrA	Controla el inicio de la esporulación; Desfosforila Spo0F
RapB	PhrC	Controla el inicio de la esporulación; Desfosforila Spo0F
RapC	PhrC	Control de la actividad de ComA; Interactúa con ComA y ComA~P
RapD	-	Inhibe la producción de surfactina; Controla la actividad de ComA
RapE	PhrE	Controla el inicio de la esporulación; Desfosforila a Spo0F
RapF	PhrE	Controla la actividad de ComA; Interactúa con ComA y ComA~P
RapG	PhrG	Controla DegU; Interactúa con DegU~P
RapH	PhrH	Controla el inicio de la esporulación y la actividad de ComA; Desfosforila a Spo0F
RapI	PhrI	Controla la transferencia del elemento genético móvil (ICEBs1); Desfosforila Spo0F
RapJ	-	Controla la cascada de fosforilación de SpoA
RapK	PhrK	Controla la actividad de ComA
RapP	PhrP	Controla la formación de la biopelícula (vía modulación de la actividad de ComA); PhrP no interactúa con RapP debido a la mutación en el gen <i>rapP</i>
RapQ	PhrQ	Controla la esporulación, producción de surfactina y la competencia genética
Rap60	Phr60	Controla la producción y secreción de proteasa
RapLS20	PhrLS20	Controla conjugación de plásmido

Los componentes de la biopelícula que producen las cepas de *Bacillus* tienen un papel muy importante en la interacción bacteria-planta y bacteria-bacteria. A través de co-cultivos *in vitro* utilizando la interacción entre la cepa *B. subtilis* 3610 y *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606, se ha observado que las colonias de la cepa 3610 con mutaciones simples, dobles o triples de componentes de la matriz extracelular (*eps*, *tasA* y *bsIA*), son invadidas por la cepa PCL1606 (Molina-Santiago *et al.*, 2019). Se argumenta que el EPS funciona como una barrera física que impide la invasión de la colonia. La carencia de una matriz extracelular funcional provocó cambios en la estructura y propiedades de la colonia como una mayor y más rápida expansión de la colonia, mayor disponibilidad de agua, distribución de surfactina dentro y en la periferia de la colonia (en cepas silvestres solo se encuentra surfactina en la periferia de la colonia), sin embargo, se sugiere que estos cambios lejos de favorecer la colonización de cepas mutantes de *B. subtilis* 3610, facilitaron la invasión de la colonia por la cepa PCL1606.

Nordgaard *et al.* (2021), construyeron cepas mutantes sencillas de cada una de las Rap identificadas en la cepa *B. subtilis* DK1042 (cepa competente derivada de *B. subtilis* NCBI 3610: cepa no domesticada con similaridad genómica a la *B. subtilis* 168) y encontraron que las mutantes sobre-expresan genes de la matriz (en condiciones de cultivo agitado) pero que la sobre-expresión no está directamente correlacionada con la formación de biopelícula (*in vitro* en agar y en interface gas-líquido) ni con la capacidad de colonización de raíz de las mutantes *Δrap-phr*. Las mutantes Rap de la cepa *B. subtilis* DK1042 incrementaron la expresión del promotor del operón *tapA-sipW-tasA*, excepto *ΔrapA*, lo cual se sugiere es debido a que las células estuvieron más bien comprometidas con el proceso de esporulación, por lo tanto, atenuaron la expresión de genes de la matriz. Se observó que las mutantes tuvieron cambios en el aspecto de la biopelícula: *ΔrapB*, J y K formaron colonias más arrugadas, *ΔrapI* y P formaron complejas pero pequeñas colonias, *ΔrapC* formó colonias más grandes, lisas y transparentes, todos los casos comparados con la cepa silvestre. Las mutantes *ΔrapA*, C, I y P, formaron películas más delgadas y no homogéneas. *ΔrapA* formó colonias más arrugadas. Se observó que las mutantes *ΔrapD*, J y P, mostraron incremento en la colonización de la raíz de *A. thaliana*, mientras que *ΔrapI* tuvo menor capacidad de colonización de la raíz de la planta.

### 2.3. Esporulación

Las esporas son un estado celular de dormancia que además es resistente a condiciones extremas de temperatura, desecación y radiación. Por esta razón, varios de los bioproductos a base de cepas de *Bacillus* que actualmente son comercializados, son formulados sólidos (polvos) a base de esporas. El proceso de esporulación se lleva a cabo a través de una cascada de fosforilación que censa la limitación de nutrientes y da como resultado la fosforilación de Spo0A (Spo0A~P) resultando en la activación de esta proteína reguladora (Losick, 2020). La esporulación inicia cuando la forma bacilar de *B. subtilis* se divide asimétricamente, elaborando un “septo polar” que da como resultado dos compartimentos genéticamente idénticos, pero morfológicamente distintos, esto es: una “célula madre” y una pequeña “espora” (Tan y Ramamurthi, 2013). En *B. subtilis* este proceso se lleva a cabo en siete etapas. En el estado 0 los cromosomas son replicados, pero no se observan cambios morfológicos representativos de la esporulación. En el estado I ocurre la condensación y el anclaje de los orígenes de replicación a los extremos de los polos de la célula. En el estado II, ocurre la formación del septo polar, seguido por el engullimiento de la espora en el estado III. En el estado IV y V inicia el ensamblaje del córtex y de la cobertura celular, respectivamente.

El estado VI ocurre la maduración de la espora, aquí lo más característico de la morfología celular es el aspecto del cromosoma de la espora el cual está altamente condensado y con estructura toroidal. En el estado VII, la célula madre se lisa, liberando la espora madura y en estado fisiológico latente hacia el ambiente (Tan y Ramamurthi, 2013). La célula emplea dos mecanismos para comprometerse con el proceso de esporulación: uno es el canibalismo y otro es el dependiente de la concentración de Spo0A~P. El canibalismo ocurre cuando las células que tienen activado a Spo0A producen dos toxinas (Skf y Sdp) que actúan cooperativamente para obstaculizar la función celular y causar su lisis, de esta forma ocurre la liberación de nutrientes que soportan el crecimiento de otras células hermanas e isogénicas dentro de la biopelícula y retrasan así la entrada al proceso de esporulación. Solo si la limitación de nutrientes permanece, las células se comprometen a esporular (Liaqat *et al.*, 2013). Spo0A es un regulador maestro que afecta el proceso de esporulación, formación de biopelícula, canibalismo y la competencia genética. Actualmente se sabe que la activación de Spo0A está determinada por efecto de cinco diferentes histidina-cinasas (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE), las cuales detectan diferentes condiciones de estrés ambiental y responden autofosforilándose (Devi *et al.*, 2015). La activación de Spo0A ocurre cuando el grupo fosfóril de la histidina cinasa es transferido vía una cascada de fosforilación entre Spo0F para formar a Spo0A~P y así activar el efecto regulador sobre la transcripción de más de un centenar de genes. La concentración de Spo0A~P dentro de la célula, es regulada por la actividad de proteínas Rap y de la fosfatasa Spo0E (Tan y Ramamurthi, 2013). El tipo celular (células móviles, células productoras de matiz extracelular y/o células formadoras de endosporas) está definido por la concentración intracelular de Spo0A~P. Con baja concentración de Spo0A~P se favorece la formación de cadenas de células y la formación de matriz extracelular a través de la proteína SinI y niveles altos de Spo0A~P causan la represión del gen *sinI*, por lo tanto, dando lugar al proceso de esporulación.

#### **2.4. *Bacillus amyloliquefaciens***

La identificación de las especies del género *Bacillus* inicialmente estaba basada en análisis básicos de caracterización bacteriana, análisis parcial de la secuencia del gen 16S rRNA, análisis del perfil de ácidos grasos y caracterización fenotípica. Sin incluir nombres sinónimos, dentro este género se agrupan 273 especies que están descritas en un filograma basado en el análisis del gen 16S rRNA; sin embargo, aún resulta complicado resolver entre especies dentro del grupo *B. subtilis* así como dentro del grupo *Bacillus cereus* (Borriss, 2020a). Otros marcadores moleculares como el gen *gyrB*, *cheA* y *rpoB* u otros genes del genoma central (genes presentes en todas las cepas de una especie) han sido propuestos para lograr la resolución taxonómica entre algunas especies (Dunlap, 2019; Borriss, 2020a). Actualmente se está utilizando la secuencia del genoma completo para lograr la resolución entre especies y finalmente su correcta clasificación taxonómica (Borriss, 2020a; Gupta *et al.*, 2020). Uno de los métodos utilizados para verificar identidades de genomas procarióticos es el ANI (Ciufu *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2018), el cual está basado en el cálculo de la identidad nucleotídica entre dos genomas centrales utilizando BLAST (ANIb) o MUMmer (ANIm). El ANI es una medida de la similitud por pares entre dos secuencias genómicas y fue propuesto para reemplazar el procedimiento experimental de hibridación DNA-DNA (DDH) (Goris *et al.*, 2007). El método ANI se basa en analizar a dos genomas trabajándolos como: genoma de base para la consulta (*query genome*) y genoma de referencia (*reference genome*). La secuencia del genoma base es

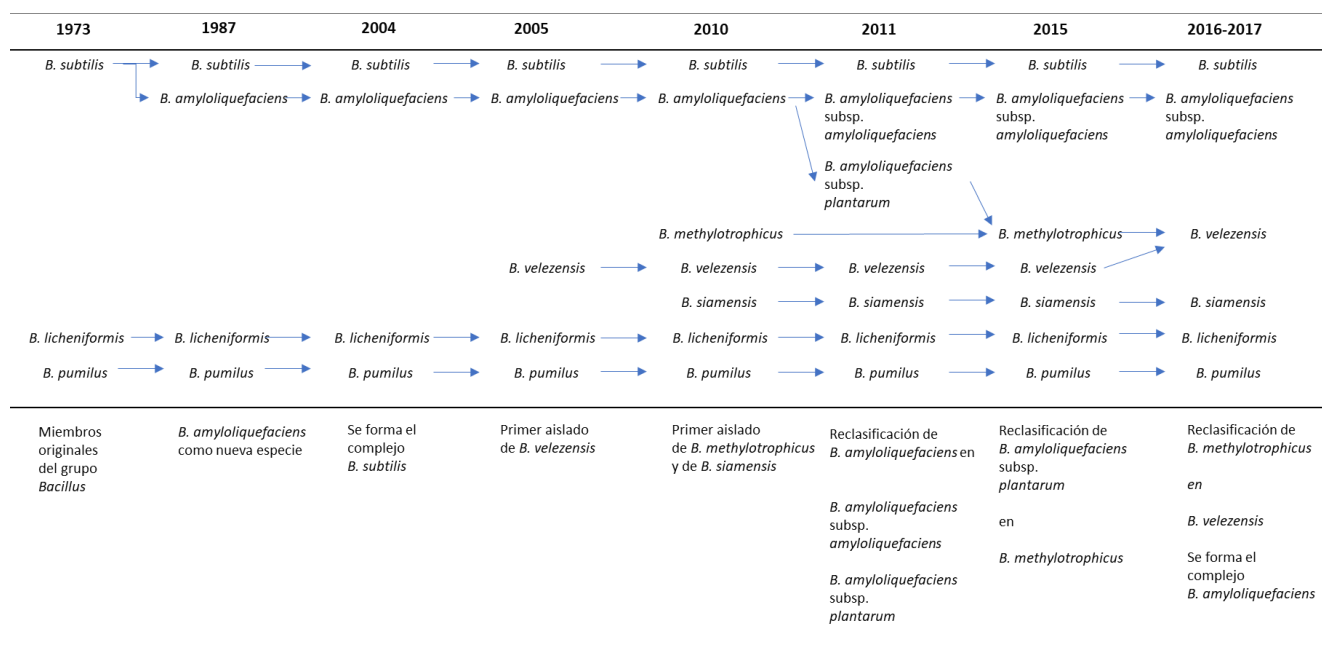
fragmentada *in silico* en secuencias largas de 1020 pb (aprox. 1 kb de DNA genómico para experimentos de DDH) y estos fragmentos se buscan en el genoma de referencia para encontrar regiones homólogas utilizando el algoritmo BLASTN. Los valores de identidad se calculan entre los fragmentos del genoma de base y las regiones homólogas en el genoma de referencia. El valor ANI resultante es la media de los valores de identidad de todos los fragmentos del genoma de base. El algoritmo ejecuta dos operaciones (Yoon *et al.*, 2017): 1) buscar fragmentos del genoma base en el genoma de referencia y 2) calcular la similitud entre los fragmentos del genoma de base y sus contrapartes homólogas en el genoma de referencia. De esta forma se ha establecido que el clado de *B. amyloliquefaciens* (o mejor conocido como “grupo operacional *Bacillus amyloliquefaciens*”) está conformado por tres especies estrechamente relacionadas: *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis* y *Bacillus siamensis*, que anteriormente había sido imposible de resolver a través del análisis de la secuencia del gen 16S rRNA (Fan *et al.*, 2017; Dunlap *et al.*, 2019). El valor de corte (*cutoff*) estándar que ha sido propuesto (Ciuffo *et al.*, 2018) para considerar que un genoma pertenece a determinada especie es ANI de 96% con 90% de cobertura del genoma con respecto al genoma de una cepa tipo (cepa representativa de la especie), con excepción de las especies *Variovorax paradoxus* (88.00 %), *Stenotrophomonas maltophilia* (88.50 %), *Lactobacillus gasseri* (93.50 %), *Streptomyces almqvistii* (99.99 %), *Streptomyces avellaneus* (99.99 %) y *Streptomyces gibsonii* (99.99 %). Existe especial dificultad para lograr la resolución entre especies de un mismo género (al menos para 12 diferentes taxones) y en estos casos el ANI es específico del grupo dentro del cual se desea lograr la resolución entre las especies. Lo anterior es debido a la alta similitud de la secuencia entre los genomas, y en esos casos se requiere el uso de análisis complementarios o la presencia de determinados genes. Por esta razón, para el ANI también han sido establecidos grupos de equivalencia en los cuales un genoma puede pertenecer a 2 o más especies como se describe en la Tabla 2:

**Tabla 2.** Equivalencia entre especies según el análisis ANI (Ciuffo *et al.*, 2018).

Especie 1	Especie 2
<i>Brucella ovis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Brucella neotomae</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>Brucella suis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>Brucella canis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Debido a la dificultad de separar filogenéticamente cepas del grupo *Bacillus* y en particular cepas dentro de la especie *B. amyloliquefaciens*, Borriss *et al.* (2011) utilizaron características geno y fenotípicas de las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. amyloliquefaciens* DMS7 para identificar cepas asociadas a plantas y cepas del suelo (no asociadas a plantas). *B. amyloliquefaciens* FZB42 fue identificada como una bacteria asociada a plantas, dentro de la especie *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* debido a su habilidad para colonizar la raíz de plantas como *Arabidopsis thaliana*, la presencia de los genes para la síntesis de siete metabolitos antimicrobianos (difidina, macrolactina, bacilaeno, iturina, fengicina, surfactina y bacilbactina) y por la presencia en su genoma de enzimas como la xilanaso, celulasa y amilasa, las cuales participan en la degradación de paredes celulares vegetales y la asimilación de carbohidratos. *B. amyloliquefaciens* DMS7 fue identificada como una cepa no asociada a plantas

dentro de la especie *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*. Posteriormente, la especie *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fue reclasificada como *B. methylotrophicus* (Dunlap *et al.*, 2015) y después como *B. velezensis* (Dunlap *et al.*, 2016). Finalmente, Fan *et al.* (2017) a través de comparar secuencias del gen de la subunidad beta de la RNA polimerasa (*rpoB*) y del genoma central de 66 cepas de *B. amyloliquefaciens* estrechamente relacionadas, describieron el “grupo operacional *B. amyloliquefaciens*” que incluye a las especies *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*, *B. siamensis* y *B. velezensis* (esta incluye a las cepas anteriormente clasificadas como *B. velezensis*, *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*). La Figura 3 (tomado de Rabbee *et al.*, 2019) describe cómo han surgido los cambios en la taxonomía del grupo *B. subtilis*.



**Figura 3.** Principales eventos que cambiaron la taxonomía del grupo *Bacillus subtilis*.

## 2.5. Grupo operacional *B. amyloliquefaciens* como promotores del crecimiento y agentes de control biológico

El actual grupo operacional *B. amyloliquefaciens* se caracteriza por contener cepas que presentan mecanismos con los cuales de forma directa o indirecta establecen relaciones benéficas con las plantas (Olanrewaju *et al.*, 2017). A través de mecanismos directos algunas cepas de *Bacillus* promueven el crecimiento vegetal debido a que mejoran la adquisición de nutrientes como el nitrógeno y el fosfato; también a través de la producción de fitohormonas tales como el IAA, enzimas como la ACC deaminasa o VOC como el 2,3-butanodiol y la acetoina (Xu *et al.*, 2014; Hanif *et al.*, 2015; Asari *et al.*, 2016, 2017; Vejan *et al.*, 2016). Las fitohormonas han sido de especial interés ya que regulan todos los procesos biológicos de la planta (Tsukanova *et al.*, 2017), entre las fitohormonas

que se sabe producen cepas de *Bacillus* están las auxinas (principalmente IAA) y otras como Et, Ck, Gb, ABA, JA y SA. Las fitohormonas activan diferentes procesos fisiológicos y moleculares que incrementan la productividad y la calidad de los cultivos a través de estimular el crecimiento y favorecer la salud de las plantas (Poveda *et al.*, 2021). Las auxinas son compuestos de bajo peso molecular y son hormonas que controlan la mayoría de los procesos fisiológicos en la planta ya que está directa o indirectamente relacionada con la actividad de otras hormonas. El IAA, ácido indol butírico (IBA), ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA) y el ácido fenilacético (PAA) son las auxinas más comunes en las plantas, siendo la de mayor abundancia el IAA.

Las auxinas son vitales para el crecimiento y desarrollo de la planta ya que son necesarias para la progresión del ciclo celular y para la liberación de la latencia de las yemas. Afectan el tamaño del meristemo del brote y la raíz, definen la morfogénesis de la flor y la posición de los primordios de órganos laterales. Las auxinas son necesarias para el gravitropismo y fototropismo de raíces y tallo. Tiene un papel muy importante para desencadenar las respuestas de la planta ante cambios en la cantidad y calidad de la luz que le permiten evitar la exposición de tejidos a la sombra, como p. ej. ajustar su crecimiento y la disposición espacial de sus tejidos (Tsukanova *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021). El IAA es un compuesto en cuya estructura se encuentra un ácido carboxílico unido a través de un grupo metileno a la posición del C3 del anillo indol y es producido por plantas y microorganismos (Keswani *et al.*, 2020). La producción de esta hormona es uno de los principales criterios para seleccionar a PGPB o PGPR. Se sabe que el IAA puede ser sintetizado a través de vías que son dependientes del L-triptófano (L-Trp) o a través de una vía de síntesis independiente de L-Trp. En plantas hay cuatro vías de síntesis que son dependientes de L-Trp: 1) indol-3-acetamida (IAM), 2) indol-3-piruvato (IPA), 3) triptamina (TAM) y 4) indol-3-acetaldoxima (IAOx). Si bien se conoce más respecto a las vías de síntesis dependientes de L-Trp, de la independiente aún se desconoce la vía de síntesis. Recientemente ha sido propuesto que en *A. thaliana* existe una vía de síntesis independiente de L-Trp en la cual participa una indol-sintasa citosólica que utiliza indol-3-glicerolfosfato (IGP) como sustrato para producir el indol que es parte de la auxina (Wang *et al.*, 2015). En bacterias Gram-positivas, hay cuatro vías de síntesis de IAA que utilizan L-Trp como precursor (Figura 4, tomado de Keswani *et al.*, 2020) y una que se sugiere es independiente de L-Trp (Shao *et al.*, 2021):

- 1) La vía IAM, en la cual el triptófano es primero convertido a IAM por una triptofano-2-monooxygenasa y posteriormente el IAM es convertido a AIA por una IAM hidrolasa. Esta vía está presente en varias bacterias fitopatógenas (p. ej. *Agrobacterium tumefaciens*).
- 2) La vía IPA, en la cual el L-Trp es primeramente convertido a IPA por una aminotransferasa (triptófano transaminasa), posteriormente el IPA es descarboxilado a indol-3-acetaldéhid (IAAId) por una indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC), como paso final ocurre una oxidación de IAAId a AIA. Esta vía de síntesis de IAA es la principal en plantas, pero también está presente en bacterias fitopatógenas (*Pseudomonas agglomerans*), en bacterias benéficas (*Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*) y en cianobacterias.
- 3) La vía de indol-3-acetonitrilo (IAN) en la cual los intermediarios pueden ser directamente convertidos a IAA por nitrilasa o convertida a IAM antes de la conversión de IAM a IAA por una nitrilo hidratasa. Esta vía la presentan principalmente plantas de la familia Brassicaceae (p. ej. *A. thaliana* y *Brassica chinensis*). Esta vía ha sido identificada en *B. amyloliquefaciens* SQR9 (Shao *et al.*, 2015).





**Péptidos ribosomales:** son derivados del procesamiento de polipéptidos (aproximadamente 100 aa) en péptidos funcionales que posteriormente sufren modificaciones post-traduccionales. Generalmente son conocidos como bacteriocinas, son compuestos de bajo peso molecular con actividad antibiótica. Algunas bacteriocinas también participan en el proceso de QS, lisis celular o en la inducción de la competencia genética de las células. Su clasificación está basada en su vía de síntesis: clase I: péptidos post-traduccionalmente modificados, clase II: péptidos no modificados y clase III: bacteriocinas de tamaño mayor a 10 kDa (Tabla 3, tomado de Caulier *et al.*, 2019). Por otra parte, están los péptidos antimicrobiales con actividad enzimática (función lítica) o de *Quorum quenching* (QQ: proceso que silencia o bloquea el QS), las primeras son degradadoras de pared celular (celulasas, glucanasas, proteasas y quitinasas) y las segundas son lactonasas, decarboxilasas, acilasas o deaminasas que inactivan a compuestos como las *N*-acil-Homoserina-Lactonas (AHLs). Las AHLs son moléculas de autoinducción para bacterias Gram-negativas que coordinan procesos como formación de biopelícula, esporulación, producción de antibióticos y de factores de virulencia.

**Tabla 3.** Clasificación de las bacteriocinas producidas por el género *Bacillus* (Caulier *et al.*, 2019).

Clase	Descripción de la clase	Sub-clase	Descripción de la subclase
I	Péptidos modificados post-traduccionalmente	I.1	Péptido sencillo, lantibióticos largos
		I.2	Otros lantibióticos péptidos sencillos
		I.3	Lantibióticos de dos péptidos
		I.4	Otros péptidos modificados
II	Péptidos no modificados	II.1	Péptidos similares a Pediocina
		II.2	Péptidos similares a Turicina
		II.3	Otros péptidos lineales
III	Péptidos grandes (>kDa)		

**Policétidos (PK):** son compuestos sintetizados por policétido sintasas (PKS) a partir de precursores del tipo acil-CoA, como por ejemplo el malonato y el metil-malonato. Los policétidos resultantes de la actividad de las PKS, son compuestos que tienen un amplio espectro de actividad antimicrobial, inmunosupresora, antitumoral, entre otras. Por su estructura química los policétidos son clasificados en siete diferentes familias: acetogeninas, ansamicinas, enediyenes, macrólidos, polienos, poliéteres y tetraciclinas. Las cepas de *Bacillus* producen macrólidos y poliéneos (o derivados de estos), principalmente (Tabla 4, tomado de Caulier *et al.*, 2019).

**Tabla 4.** Principales clases de policétidos producidos por el género *Bacillus* (Caulier *et al.*, 2019).

Clase de Policétido	Descripción de la estructura
Acetogeninas	Son cadenas lineales de carbonos con grupos funcionales oxigenados albergando un anillo terminal $\gamma$ -lactona
Ansamicinas	Compuestos con un puente entre una mitad aromática y una cadena alifática
Enedinas	Compuestos caracterizados por una estructura central formada por un enlace C-C doble conjugado a dos grupos aceliénicos
Macrolidos	Grandes anillos macrocíclicos de lactona con uno o más desoxiazúcares
Poliénos	Compuestos orgánicos poli-insaturados conteniendo al menos tres enlaces C-C sencillos o dobles de forma alternada
Poliéteres	Polímeros conteniendo más de un grupo éter
Tetraciclinas	Familia de compuestos caracterizados por un típico sistema de cuatro anillos

**Péptidos no ribosomales (NRP):** Estos compuestos muestran una amplia variedad de estructuras y funciones biológicas. Se reconocen dos clases de NRP en función de si son sintetizados por multienzimas Péptido Sintetasas No-Ribosomales (NRPS) a través de un mecanismo de que depende de un tío-templado para la síntesis del compuesto o por multienzimas a través de un mecanismo independiente del tío-templado. El mecanismo dependiente del tío-templado tiene como producto lipopéptidos o sideróforos, mientras que el independiente del tío-templado tiene como productos péptidos cíclicos. Por su estructura química los NRP son clasificados en cuatro principales familias: surfactinas, iturinas, fengicinas y kurstatinas (Tabla 5, tomada de Caulier *et al.*, 2019).

**Tabla 5.** Principales familias de NRP (Caulier *et al.*, 2019).

Familia	Surfactina	Iturina	Fengicina	Kurstacinas
Longitud del péptido	Heptapéptido	Heptapéptido	Decapéptido	Heptapéptido
Secuencia quiral	LLDLLDL	LLDLLDL	LDDDLDDLL	Desconocido
Tipo del ácido graso	$\beta$ -hidroxi	$\beta$ -amino	$\beta$ -hidroxi	$\beta$ -hidroxi o no
Longitud del ácido graso	13-15 carbonos	14-17 carbonos	16-19 carbonos	11-14 carbonos
Estructura	Lactona cíclica	Péptido cíclico	Lactona cíclica	Lactona cíclica

**Compuestos Volátiles:** se clasifican en Compuestos Inorgánicos Volátiles (VIC) y en Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC) y tienen una amplia variedad de funciones biológicas. Los VIC son compuestos carbonados, hidrogenados, o compuestos que contienen sulfuro, nitrógeno o nitrógeno (CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>, HCN, H<sub>2</sub>S, N<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> o NO). Los compuestos que contienen nitrógeno son los liberados por bacterias nitrificantes (proceso en el cual el óxido nítrico es producido enzimáticamente por la actividad de una nítrico-óxido reductasa o una nítrico-óxido sintasa). Los VOC provienen principalmente de la oxidación de la glucosa involucrando el proceso de glicólisis y ciclos subsecuentes del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), pero también puede derivarse del metabolismo aerobio heterotrófico del carbono, procesos de fermentación, degradación de aa, de terpenos o reducción de sulfuro. Se reconocen cinco tipos diferentes de VOC producidos por bacterias: 1) ácidos grasos y derivados, 2) terpenoides, 3) VOC con nitrógeno, 4) VOC con sulfuro y 5) VOC halogenados o metaloides. El género *Bacillus* produce VOC derivados de ácidos grasos (como alcoholes, cetonas, aldehídos, alquenos y ácidos) así como VOC con sulfuro o nitrógeno (Caulier *et al.*, 2019), algunos ejemplos de los VOC producidos por cepas de *B. velezensis* se muestran en la Tabla 6.

El control biológico con cepas de *Bacillus* ha sido de especial interés ya que además de la antibiosis, también implica la competencia por espacio-nutrientes (caracterizada por la formación de biopelícula) y, en algunos casos, ISR en la planta (Fan *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). De esta forma, debido a la interacción de los tres diferentes mecanismos de control biológico de *B. velezensis*, se puede reducir la incidencia y severidad de enfermedades en las plantas (Fan *et al.*, 2018; Rabbee *et al.*, 2019). La actividad antimicrobial de los metabolitos (p. ej. lipopéptidos, policétidos, enzimas, sideróforo o VOC) de las cepas de *Bacillus* ha sido ampliamente estudiada (Borriss, 2016; Fan *et al.*, 2018; Fira, 2018; Rabbee *et al.*, 2019; Keswani *et al.*, 2020; Rabbee y Baek, 2020). La antibiosis y la ISR han sido los principales criterios de selección para identificar a las cepas de este género como agentes de control biológico. La capacidad de formar biopelículas y por lo tanto lograr la eficiente colonización (y así la competencia por espacio y nutrientes) de la planta, también es una característica muy importante para el control biológico del fitopatógeno (Al-Ali *et al.*, 2018). Para entender cómo los factores de antagonismo de un ACB, esto es: cómo las células o los metabolitos contribuyen en la eficacia de los tratamientos biológicos se han establecido diferentes estrategias utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar el antagonismo por antibiosis, ISR y la competencia por espacio-nutrientes. De esta forma existen varios trabajos enfocados a evaluar el efecto de los metabolitos producidos por las bacterias del género *Bacillus* y su relación con los diferentes mecanismos de acción.

Actualmente, existen investigaciones que han utilizado a los productos comerciales como modelos de estudio para entender cómo los factores de antagonismo contribuyen en el control biológico de los fitopatógenos en las plantas o frutos. Un ejemplo es un producto para aplicación en suelo formulado con *B. subtilis* QST713 (nombre comercial: SERENADE) el cual está compuesto por células+metabolitos+excipientes. Lahlali *et al.* (2011) evaluaron la contribución de los factores de antagonismo de *B. subtilis* QST713 en el control biológico del hongo *Plasmodiophora brassicae*, el cual es causante de “gallos” en raíz de canola. Con tratamientos aplicados en suelo, se encontró que tanto las células como los metabolitos redujeron la severidad de la infección aproximadamente 60% y con el producto formulado la reducción fue más del 90%, con respecto a un control. Esta es una evidencia de que la interacción entre los metabolitos y las células contenidos en el producto formulado da como resultado un mejor control biológico (Lahlali *et al.*, 2011).

**Tabla 6.** Ejemplos de VOC producidos por cepas de *Bacillus*.

Cepa	Fitopatógeno	Fruto o planta	Compuesto volátil	Actividad	Referencia
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CPA-8	<i>Monilinia laxa</i> <i>M. fructicola</i> <i>Botrytis cinera</i>	Cereza	1,3-Pentadieno, Acetoína Tiofeno	Antifúngica	Gotor-Vila <i>et al.</i> , 2017
<i>B. amyloliquefaciens</i> BUZ-14	<i>B. cinerea</i> <i>M. fructicola</i> <i>M. laxa</i> <i>Penicillium italicum</i> <i>P. digitatum</i> <i>P. expansum</i>	Mandarina Uva Manzana Chabacano	2-Undecanona 2-Heptanona 1-Butanol Acetoína Benzaldehído Butil formato Diacetil Nonano Pirazina	Antifúngica	Calvo <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus methylotrophicus</i> ( <i>B. velezensis</i> )	<i>Fusarium</i> <i>Botryosphaeria sp.</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Níspero japonés	Alcoholes Fenoles Cetonas Hidrocarburos Aldehídos Ésteres Ácidos	Antifúngica	He <i>et al.</i> , 2020
<i>B. velezensis</i> XT1	<i>B. cinerea</i> <i>M. fructicola</i> <i>M. laxa</i>	Cereza	Acetoína Ácido acético Isopentanol	Antifúngica	Toral <i>et al.</i> , 2021
<i>B. amyloliquefaciens</i> L3 ( <i>B. velezensis</i> )	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i> (FON)	Sandía  <i>A. thaliana</i>	2-Heptanona 2-Etil-1-hexano 2-Nonanona Undecanona 2-Dodecanona 2-Undecanol Acetoína 2-Tridecanona 2,3-Butanodiol	Antifúngica  Promoción del crecimiento	Wu <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus subtilis</i> SYST2		Jitomate	Albuterol 1,3-Propanediol	Promoción del crecimiento	Tahir <i>et al.</i> , 2017
<i>B. subtilis</i> GB03 ( <i>B. velezensis</i> ) <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a		<i>A. thaliana</i>	3-Hidroxi-2-butanona 2,3-Butanodiol	Promoción del crecimiento	Ryu <i>et al.</i> , 2003
<i>B. subtilis</i> GB03 <i>B. subtilis</i> IN973a	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp.	<i>A. thaliana</i>	Acetoína Tridecano	ISR	Farag <i>et al.</i> , 2013
<i>B. subtilis</i> GB03	<i>B. cinerea</i>	<i>A. thaliana</i>	2,3-Butanodiol Acetoína	ISR y SAR	Shafiri & Ryu, 2016
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 <i>Bacillus artrophaeus</i> LSSC22	<i>Ralstonia solanacearum</i> TBBS1	Tabaco	Benzisotiazol Trimetilbicloheptano Ácido benzoico Dodecano-1-fluoro Dodecano Fenol-2-(1,1-dimetil-etil)-6-metil	Antibacterial ISR	Thair <i>et al.</i> , 2017

Posteriormente, fue evaluado el efecto de SERENADE en la ISR en plantas de canola para el control de *P. brassicae*. Se encontró que el tratamiento con el producto formulado fue más efectivo para reducir la incidencia de infección y la concentración del fitopatógeno en la raíz, que al utilizar los componentes de manera individual. Se detectó que las células de *B. subtilis* QST713 se establecieron en mayor concentración en la raíz cuando fueron aplicadas como parte del formulado, que cuando fueron aplicadas como células aisladas, lo que indica que los metabolitos contenidos en el producto formulado favorecieron el establecimiento de *B. subtilis* QST713. Aunado a esto, la aplicación del producto formulado al momento de la siembra de la canola, redujo la incidencia de infección por

*Leptosphaeria maculans* en cotiledones de plantas de canola durante 12 días, con respecto a plantas sin tratamiento biológico, indicando la existencia de la ISR. Se comprobó la sobreexpresión de genes involucrados en la ISR, la sobreexpresión en raíz fue para los genes involucrados con la síntesis de Et (BnACO), JA (BNOPR2), c-innaoil CoA reductasa (BnCCR) y fenilpropanoides (BnOPCL), en contraste en hojas fue sólo para fenilpropanoides (BnOPCL y BNCCR) (Lahlali *et al.*, 2013).

Otras cepas de *Bacillus* ya han sido también comercializadas como bioproductos (Tabla 7, tomado de Keswani *et al.*, 2020) para control de fitopatógenos desde hace poco más de cinco décadas (Dunlap *et al.*, 2019; Saxena *et al.*, 2019; Keswani *et al.*, 2020). Actualmente el mayor porcentaje de los bioproductos registrados en tanto en los EE.UU. (<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/biopesticide-active-ingredients>) como en México (SENASICA 2022, <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>) contienen cepas de *B. turingiensis* (bioinsecticida), *B. amyloliquefaciens* o *B. subtilis*, siendo estas dos últimas las más utilizadas como biofungicidas, estimulantes del crecimiento y/o causantes de ISR.

La cepa más estudiada y ampliamente utilizada como un modelo para estudios de control biológico de fitopatógenos así como PGPR es *B. amyloliquefaciens* FZB42, esta cepa es actualmente comercializada como RhizoVital® (Chowdhury *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2018). Como se describió anteriormente, *B. amyloliquefaciens* FZB42 ha sido reclasificada taxonómicamente dentro de la especie *B. velezensis* (Fan *et al.*, 2017) al igual que otras cepas como la FZB24, GB03, MBI600, QST713, D747 (por mencionar algunas), que también son parte de bioproductos comerciales (Dunlap *et al.*, 2019). En la cepa *B. velezensis* FZB42 los genes dedicados a la función de síntesis de metabolitos antimicrobiales ocupa casi el 10 % de su genoma (Chowdhury *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2018). Entre los principales metabolitos antimicrobianos sintetizados por esta cepa se encuentran lipopéptidos, policétidos y bacteriocinas, adicionalmente se sabe que la cepa FZB42 estimula el crecimiento de plantas como papa, maíz, tabaco, entre otros, a través de la producción de IAA, 2,3-butanodiol/acetoína y fitasa (solubilización de fostato) (Borriss, 2020b).

Las primeras cepas de la especie *B. velezensis* (cepa CR-502T y cepa CR-14b) fueron aisladas por primera vez de muestras tomadas de la desembocadura del río Vélez en Torre del Mar en la provincia de Málaga, España. Las pruebas fenotípicas y los análisis filogenéticos indicaron que las cepas eran miembros del género *Bacillus* y que estaban estrechamente relacionadas con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*. Experimentos adicionales utilizando la técnica de análisis de DDH revelaron que esas cepas poseían menos del 20% de similitud con otras especies de *Bacillus*, por lo que se reportó como una nueva especie. Esta especie tiene en su genoma genes cuyos productos participan en la vía de síntesis de compuestos antibacteriales, antifúngicos, nematicidas, sideróforo, VOC que tienen efecto directo (antibiosis) o indirecto (ISR) en el control de fitopatógenos (Rabbee *et al.*, 2019).

**Tabla 7.** Productos a base de cepas del grupo de *Bacillus* comercialmente disponibles (Keswani *et al.*, 2020).

Cepa	Actividad	Nombre comercial	Compañía
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Biofungicida	Kodiak™	Bayer Crop Science, former Gustafsson LLC
<i>Bacillus subtilis</i> GB03	Biofungicida: iturina e ISR	Companion	Growth Products Ltd., White Plains, NY 10603
<i>B. amyloliquefaciens</i> GB99 + <i>Bacillus subtilis</i> GB122	ISR por GB99 y fitoestimulación por GB122	BioYield™	Bayer Crop Science, previously Gustafsson
<i>Bacillus subtilis</i> MBI600	Biofungicida para <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp. Preventivo para <i>damping-off</i> y otras enfermedades de raíz	Subtillex®, INTEGRAL®	Becker Underwood, Saskatoon, Canada acquired by BASF
<i>Bacillus subtilis</i> MBI600	Mejoramiento del crecimiento de frijol y cacahuete	VAULT®	Becker Underwood, Saskatoon, Canada
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Biofungicida	SERENADE Max	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Biofungicida	SERENADE SOIL®	Bayer Crop Science, previously AgraQuest
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Biofungicida, recomendado para hortalizas, hierbas y especias, y plantas ornamentales.	CEASE®	BioWorks, Inc., Victor, New York, USA
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	Biofertilizante, estimulante del crecimiento vegetal, biofungicida contra fitopatógenos del suelo, ISR	RhizoVital®	ABiTEP GmbH, Berlin
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	Biofungicida	Taegro®	Syngenta, Basel, previously Novozyme, Davis, California and Earth Biosciences
<i>Bacillus subtilis</i> CMB26	Biofungicida para <i>powdery mildew</i> , <i>Cladosporium fulvum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	POMEX	NIN Co. Ltd.,
<i>Bacillus subtilis</i> CX9060	Biofungicida y bactericida para uso en cultivos agrícolas, pasto y hornamentales		Certis Columbia, MD USA
<i>Bacillus subtilis</i> E4-CDX	Biofungicida para fitopatógenos de raíz	Easy Start® TE-Max	COMPO Expert GmbH, Münster, Germany
<i>B. amyloliquefaciens</i> D747	Control de hongos y bacterias fitopatógenas ( <i>powdery mildew</i> , <i>Sclerotinia</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Alternaria</i> , <i>bacterial leaf spot</i> , <i>bacterial spot</i> and <i>speck</i> , <i>fire blight</i> , <i>Xanthomonas</i> ,	Double Nickel 55™	Certis Columbia, MD USA
<i>B. amyloliquefaciens</i> D747	Control de <i>Botrytis</i> y otras enfermedades causadas en hongos en uvas, fresas y vegetales. Control de enfermedades causadas por bacterias: <i>Erwinia amylovora</i> en manzana y <i>Pseudomonas syringae</i> pv.	Amylo-X®	Certis Columbia, MD USA/Intrachem Bio Italia SpA
<i>Bacillus pumilus</i> QST2808	Biofungicida, control de <i>powdery mildew</i>	SONATA®	Bayer Crop Science, previously AgraQuest Inc
<i>Bacillus pumilus</i> GB34 (=INR7)	Biofungicida para fitopatógenos de raíz	Yield Shield	Bayer Crop Science, previously Gustafsson
<i>Bacillus pumilus</i> BU F-33	Estimulante del crecimiento vegetal e ISR		Becker Underwood, Saskatoon, Canada
<i>Bacillus pumilus</i> GHA 181	Biofungicida para uso en cultivos agrícolas, tratamiento de semillas y plantas ornamentales		Premier Horticulture

Los lipopéptidos que sintetizan las cepas de *B. velezensis* pertenecen a tres familias: surfactinas, iturinas y fengicinas, mucho de lo que se conoce respecto a la síntesis, estructura química, propiedades fisicoquímicas y

actividad biológica de estas moléculas, ha surgido de investigación realizada con cepas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis*. Actualmente se sabe que la surfactina es un lipopéptido que tiene actividad principalmente antibacteriana y en algunos casos antifúngica, este lipopéptido está estrechamente relacionado con la formación de biopelícula, es causante de ISR en las plantas, y recientemente, se sabe que es un componente importante en la señalización de QS para el proceso de diferenciación celular, la esporulación-competencia celular y en el metabolismo del carbono (Rahman *et al.*, 2021).

Con el uso de cepas mutantes de *Bacillus* no productoras de surfactina, se ha observado que la no producción de surfactina afecta la eficacia de control contra bacterias. En la cepa mutante *B. subtilis* 9407  $\Delta$ *srfAB* la falta de producción de surfactina, causó deficiencias en formación de biopelícula, se observó escasa colonización en raíz y en hojas de melón, adicionalmente el movimiento tipo *swarming* de la bacteria fue disminuido, finalmente la mutante mostró baja eficacia de control de la infección causada por *Acidovorax citrulli* MH21 en melón cultivado en invernadero (Fan *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha reportado que las cepas *B. subtilis* NH-100 y *Bacillus sp.* NH-217 producen surfactina A y que fue el lipopéptido con actividad antifúngica que esas cepas produjeron contra *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Trichoderma atroviride* y *T. reesei* (Sarwar *et al.*, 2018) inhibiendo hasta 84% el crecimiento micelial *in vitro* de *F. moniliforme*. También ha sido reportado que la cepa *B. subtilis* UMAF6614 *srfAB* mutante no productora de surfactina, muestra afectaciones en la producción de dos componentes importantes de la biopelícula como lo son TasA y el EPS, la motilidad tipo *swarming* y la esporulación, lo cual resulta en pobre colonización y persistencia de la cepa en hojas de melón, así como menor control de la infección causada por *Xhantomonas campestris* en hojas de melón (Zeriuouh *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la surfactina fue el lipopéptido que produjo en mayor abundancia la cepa *B. amyloliquefaciens* S499 al ser inoculada en raíces de plantas como jitomate y Arabidopsis, y se sabe que el xilano es el polímero componente de la pared celular vegetal que induce la transcripción del gen *srfA* en la cepa S499, así como en la FZB42 y QST713 (Debois *et al.*, 2015), adicionalmente, la surfactina que produjo la cepa S499 causó ISR contra la infección de *B. cinerea* en plántulas de Arabidopsis. Se sabe que la cepa *B. velezensis* GA1 incrementó 10 veces más la producción de surfactina como respuesta a la detección de pectina extraída de raíz de plantas de tabaco y similar comportamiento ha sido observado para las cepas FZB42, QST713 y S499, por otra parte, se ha identificado que las surfactinas con ácido graso de cadena larga (C<sub>14</sub> o C<sub>15</sub>) son las que causan ISR contra *B. cinerea* en plantas de tabaco crecidas en sistemas hidropónicos (Hoff *et al.*, 2021).

El efecto de los metabolitos causantes de ISR se basa en una rápida y fuerte activación de los mecanismos de defensa basales, desencadenando un fenómeno llamado *priming* que hace que la planta reaccione más rápido y efectivamente ante los fitopatógenos. El *priming* de la ISR provee un amplio espectro de protección a enfermedades. Se ha reportado que la ISR causada por los lipopéptidos producidos por cepas de *Bacillus*, como el caso de la surfactina, es generalmente independiente de la vía de señalización del SA y es más bien dependiente de JA-ET (Ongena *et al.*, 2007; Jourdan *et al.*, 2009; García-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Por otro lado, los estudios de control biológico realizados con cepas de *Bacillus* demuestran que los lipopéptidos de la familia de la iturina tienen el mayor efecto de inhibición contra hongos fitopatógenos. La familia de la iturina comprende: iturina, bacilomicina D, bacilomicina F, bacilomicina L, micosubtilina y mojavensina. Las iturinas son heptapéptidos cíclicos con longitud variable de la cadena lateral de alquilo, la cual le confiere actividad surfactante que favorece la afinidad hacia las membranas fúngicas. Las moléculas de iturina se incorporan a la membrana



celular fúngica y crean poros en la pared celular, lo cual provoca la pérdida de contenido celular y la finalmente la muerte de la célula (Dunlap *et al.*, 2019). La especie *B. velezensis* produce tres tipos de iturina: iturina A, bacilomicina D y L (Dunlap *et al.*, 2019). Se ha reportado que la iturina A de la cepa *B. amyloliquefaciens* S13-3 tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre especies de los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Mucor*, *Mycosphaerella* y *Phytophthora* (Mochizuki *et al.*, 2012). A través de ensayos *in vitro* e *in planta* con la cepa *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BUZ-14 (Calvo *et al.*, 2019), se ha observado que el sobrenadante del cultivo (de 96 h de incubación) de la bacteria o la fracción de lipopéptidos (extraídos con butanol) muestran similar actividad contra hongos fitopatógenos que afectan frutos post-cosecha. Se ha identificado que en la fracción de lipopéptidos que produjo la cepa BUZ-14, la iturina A fue el metabolito que inhibió el crecimiento *Botrytis cinerea* (en fresa), *Monilinia fructicola* (en durazno), *Monilinia laxa* (en durazno), *Penicillium digitatum* (en mandarina), *P. expansum* (en manzana) y *Penicillium italicum* (en mandarina). Se observó que la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) de iturina A necesaria para inhibir el crecimiento de cada fitopatógeno fue diferente tanto *in vitro* como en ensayos llevados a cabo en frutas (*in planta*), siendo las especies de *Monilinia* y de *P. expansum* las más susceptibles. Con ensayos de inoculación de la cepa BUZ-14 en frutas, se observó que sólo en durazno la bacteria incrementó su población (UFC) más de tres órdenes de magnitud e inhibió al 100% la infección por especies de *Monilinia* lo cual fue atribuido a la producción *in situ* de iturina (Calvo *et al.*, 2019). Se ha reportado que *B. subtilis* WL2 produce iturina A, este lipopéptido ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) inhibió el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans* (causante de tizón tardío de la papa) debido a que dañó la membrana celular, provocó estrés oxidativo y a que afectó el suministro de energía en la célula (Wang *et al.*, 2020). La bacilomicina D es otro lipopéptido que pertenece a la familia de las iturinas, con el uso de cepas mutantes, se ha demostrado que *B. amyloliquefaciens* SQR9 produce bacilomicina D y que inhibe la germinación del 96% de las esporas de *F. oxysporum*. Al parecer, la bacilomicina D, además participa como molécula de señalización en la transcripción genes (*yqxM*, *kin C* y *epsD*), relacionados con la formación de la biopelícula. En este sentido se ha mostrado evidencia de que una cepa mutante (SQR9M1) no productora de bacilomicina estableció su población en menor cantidad que la cepa silvestre en la raíz de plántulas de mango (Xu *et al.*, 2013).

Las fengicinas son lipopéptidos que también tienen actividad antifúngica contra varios hongos fitopatógenos. La estructura de las fengicinas se compone de octapéptidos cíclicos que contienen decapeptidos unidos a la cadena del ácido graso  $\beta$ -hidroxi N-terminal, generalmente la longitud de la cadena lipídica es de C12 a C19. Se han identificado dos isoformas de fengicina: fengicina A y fengicina B las cuales difieren estructuralmente, debido a la presencia de dimorfismo Ala/Val en la sexta posición. Las fengicinas son sintetizadas por NRPS codificadas por un operón *fenaA-E* o *ppsA-E* (Rabbee y Baek, 2020). Se ha observado que las fengicinas tienen efecto inhibitorio sobre *Podosphaera fusca* (hongo causante de cenicilla en cucurbitáceas) y reducen la severidad de la infección por este fitopatógeno en hojas de melón, pero con menor efecto que la iturina (Romero *et al.*, 2007). Sin embargo, en ensayos *in vitro* se observó que una cepa de *B. amyloliquefaciens* productora de fengicina y surfactina (ARP<sub>23</sub>) tiene mayor efecto inhibitorio que una cepa productora sólo de iturina (MEP<sub>218</sub>) sobre el crecimiento micelial de *Sclerotinia sclerotium* (Alvarez *et al.*, 2012). En ensayos *in vitro*, tanto la fengicina como la bacilomicina D de *B. amyloliquefaciens* C06 inhibieron la germinación del 98% de las esporas de *Monilinia fructicola*, pero sólo la fengicina afectó el crecimiento micelial de este hongo (Liu *et al.*, 2011). En contraste, la fengicina que produce la cepa *B. amyloliquefaciens* SQR9 sólo inhibe menos del 40% de la población de esporas de *F. oxysporum* (Xu *et al.*, 2013). Se ha reportado que la cepa *B. amyloliquefaciens* Q-426 (productora de bacilomicina D y fengicina) afectó el crecimiento *in vitro* de fitopatógenos de los géneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*,

*Curvularia*, *Exersohilum*, *Fusarium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Pelicularia*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Rizhopus*, *Rosellinia* y *Sclerotinia* (Zhao *et al.*, 2013). *B. velezensis* FZB42 afecta de manera significativa el crecimiento de *F. graminearum* micelial *in vitro* debido a la producción de fengicina, así como la producción de micotoxinas (como el desoxinivalenol) del fitopatógeno y la infección en granos de trigo; Con el uso de micrografías electrónicas se observó que las hifas de *F. graminearum* expuestas a fengicina presentaron deformaciones morfológicas: las hifas tenían aspecto delgado, retorcido y secciones de la hifa con ruptura de pared celular (Hanif *et al.*, 2019).

Los policétidos que sintetizan las cepas de *Bacillus* han sido reportadas con actividad antibacteriana principalmente (Mongkolthanasakul, 2012). Las cepas de la especie *B. amyloliquefaciens* producen 3 policétidos simultáneamente: bacilaeno, macrolactina y difidina, pero en diferente cantidad y con diferente efecto inhibitorio. En bioensayos realizados con inflorescencias de manzana se observó que el porcentaje de inhibición de la infección por la bacteria *Erwinia amylovora* fue mayor con cepas que tenían la mayor producción de bacilaeno y difidina. El policétido macrolactina no tuvo efecto sobre la bacteria fitopatógena. Con el uso de *B. amyloliquefaciens* FZB42 y dos mutantes deficientes en la producción de los policétidos (CH8  $\Delta dfn$  y CH14  $\Delta bae \Delta mln$ ) se ha demostrado que la difidina es el metabolito con mayor actividad inhibitoria contra *E. amylovora*. Una mutante que no produjo lipopéptidos ni policétidos (CH3  $\Delta sfp$ ) también mostró actividad inhibitoria, encontrándose que la cepa FZB42 produce además bacilisina, el cual es un dipéptido de síntesis no ribosomal (no dependiente de la enzima *Sfp*: fosfopanteteinil transferasa) (Chen *et al.*, 2009). En contraste, la macrolactina sintetizada por *B. amyloliquefaciens* NJN-6 tuvo un débil efecto antifúngico sobre *F. oxysporum*, pero fuerte efecto bacteriostático contra la bacteria fitopatógena *Ralstonia solanacearum* (Yuan *et al.*, 2012). A través de ensayos de depredación *in vitro* utilizando cepas de *B. subtilis* NCIB3610 (presa) no productoras de policétidos [con mutaciones en el gen *sfp* y *pksL* (gen de una policétido sintasa tipo I)] que fueron confrontadas con *Myxococcus xanthus* (depredador), se observó que el bacilaeno fue el principal factor que inhibió el crecimiento *in vitro* de *M. xanthus* (Müller *et al.*, 2014). La sobrevivencia de *B. subtilis* NCIB3610 fue menor a 1.4%, mientras que el crecimiento de *M. xanthus* fue de 407%. En vista de que las esporas de *B. subtilis* fueron resistentes a la depredación de *M. xanthus*, los resultados sugieren que el bacilaeno es un metabolito secundario que “protege” transitoriamente a las células vegetativas de cepa NCIB3610 de la depredación de bacterias como *M. xanthus* mientras se convierten en esporas maduras (Müller *et al.*, 2014). *B. methylotrophicus* DR-08 es una cepa que ha sido reportada inhibir el crecimiento de bacterias fitopatógenas de jitomate, la cepa DR-08 inhibió el crecimiento de bacterias que pertenecen a los géneros *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Xanthomonas*, siendo la especie *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* las más susceptible, ya que requirió la más baja MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de esos policétidos comparando contra otras especies evaluadas (Im *et al.*, 2019).

El género *Bacillus* produce VOC derivados de ácidos grasos (como alcoholes, cetonas, aldehídos, alquenos) así como VOC con sulfuro o nitrógeno. A través de ensayos *in vitro* y con técnicas como Head-Space acoplado a análisis de CG-masas, se detectó que las cetonas fueron los principales VOC producidos por cepas de *Bacillus* (*B. subtilis* XF-1, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* cepas FZB42 y YAU B9601- Y2, *B. subtilis* 168, *Bacillus* spp. cepas 033, 041, 355 y 285) con actividad inhibitoria del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium solani* (Li *et al.*, 2015). También ha sido identificado que entre los VOC que produce *B. amyloliquefaciens* L3, la 2-nonanona y 2-heptanona fueron los compuestos que inhibieron 100% del crecimiento micelial *in vitro* de *F. oxysporum* (Wu *et al.*, 2019). Se ha observado que el perfil cualitativo tanto como el cuantitativo de VOC es dependiente de la cepa. Por otra parte, el 2,3-butanodiol y la acetoína, han sido los VOC más reportados como compuestos volátiles

promotores del crecimiento vegetal que producen las cepas de *Bacillus* en interacción con *A. thaliana* (Wu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019), pero albuterol y 1,3-propanediol han sido reportados promover el crecimiento de plantas de jitomate (Tahir *et al.*, 2017).

Actualmente existen muchos reportes de control biológico utilizando cepas de *Bacillus*. La antracnosis causada por el hongo *C. gloeosporioides* ha sido un caso importante de estudio, ya que además del mango afecta a otros cultivos de frutas tropicales como papaya y plátano causando considerables pérdidas económicas a nivel mundial. Se ha estimado que la afectación de antracnosis en frutos de mango post-cosecha puede estar entre el 30-60% (Allende-Molar, 2001), sin embargo, debe considerarse que la antracnosis afecta desde la etapa pre-cosecha (afecta la floración y causa la momificación de los frutos) entonces la pérdida de mango puede ser mayor. En árboles de mango, los conidios de *C. gloeosporioides* son formados abundantemente en la filósfera del árbol y es considerada ser la fuente primaria de inóculo. En el campo, *C. gloeosporioides* produce conidios sobre hojas con lesiones, tallos, panículas y frutas momificadas. Los conidios se logran dispersar a través de la lluvia o el viento y causan infecciones secundarias; por lo que la enfermedad es policíclica en estos órganos y en árboles de mango la antracnosis es la enfermedad más común. En el caso de la antracnosis post-cosecha, la fruta está infectada desde el campo, pero las infecciones permanecen quiescentes hasta que el fruto madura. Las lesiones comienzan a desarrollarse al grado de ser evidentes a la vista como manchas oscuras, lo cual afecta la calidad y por lo tanto las posibilidades de exportación del fruto. Los tratamientos pre-cosecha para el control de antracnosis involucran la aspersión mensual de fungicidas como el oxiclورو de cobre, Mancozeb (Ditiocarbamato) o Benomyl (Benomilo). Sin embargo, el uso continuo de químicos puede generar resistencia del patógeno, daños al medio ambiente y a la salud humana por la presencia de residuos tóxicos, limitando también sus posibilidades de exportación. Es importante mencionar que desde el año 2016, debido al volumen de producción México se ha colocado entre los 10 primeros lugares de países productores de mango, ocupando el tercer lugar como productor y el primero como exportador de mango (FAOSTAT 2021, <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>). Dada la importancia económica que presenta este cultivo para México (y otros países en el mundo) y a que es uno de los cultivos afectados por antracnosis, resulta un interesante caso de estudio para proponer alternativas de control biológico.

Por otra parte, *B. cinerea* (mejor conocido como moho gris) es la segunda especie de hongo fitopatógeno más importante a nivel mundial ya que afecta a más de 200 especies de plantas (incluyendo el jitomate) por lo que ha sido utilizado como un modelo de estudio en interacciones hongo fitopatógeno-planta (Dean *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2020). Es un hongo necrotrófico que puede afectar partes foliares de la planta, causando síntomas severos tales como pudriciones, caída del fruto y en ocasiones la muerte de la planta. El control tradicional de *B. cinerea* se basa principalmente en la aplicación de fungicidas químicos como anilino pirimidinas, hidroxianilidas, fenilpirroles, dicarboxamidas, benzimidazoles y compuestos que afectan la cadena respiratoria (actividad de la succinato deshidrogenasa) y generación de energía en la célula que han causado su resistencia haciendo más difícil su control (Samaras *et al.*, 2021). El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas con mayor valor de producción a nivel mundial. En 2019, la producción mundial de tomate fue de 180 millones de toneladas y China fue el principal país productor con 62 millones de toneladas, aportando el 35% de la producción mundial total. En ese año, México produjo 4 millones de toneladas que representan el 2% de la producción mundial y fue el país con mayor nivel de exportación de tomates en el mundo (1.8 millones de toneladas), siendo EE.UU., Alemania, Francia, Rusia y Reino Unido, los principales consumidores (FAOSTAT 2021,

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>). En México, el tomate es la hortaliza más importante producida en agricultura protegida (malla sombra e invernadero), por lo que el control biológico de fitopatógenos ha sido propuesto como alternativa (Samaras *et al.*, 2021).

## 2.6. Fungifree AB®: biofungicida contra fitopatógenos foliares y como promotor del crecimiento de plantas

*B. subtilis* 83 fue aislada del follaje de árboles de mango en campos de cultivo ubicados en El Rosario, Sinaloa. A través de ensayos de antagonismo *in vitro*, la cepa fue seleccionada como ACB debido al efecto de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*. Las primeras evaluaciones de la efectividad biológica de *B. subtilis* 83 (formulación líquida) para el control de antracnosis fueron realizadas en el año 2003 para determinar la dosis y frecuencia de aplicación de la bacteria en campos de cultivo de mango variedad Kent, ubicados en el Rosario, Sinaloa (Carrillo-Fasio *et al.*, 2005). Otros trabajos de investigación con *B. subtilis* 83 han abordado aspectos como la identificación de marcadores moleculares para el seguimiento de la población de *B. subtilis* 83 cuando es aplicada en campo (Aragón-Gómez, 2012), la identificación y evaluación de la actividad biológica *in vitro* del principal lipopéptido antifúngico (bacilomicina D) que la bacteria produce contra hongos como *C. gloeosporioides* (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018), y estrategias de cultivo para la producción de esporas y metabolitos antimicrobianos (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2020).

Solis-Arcos (2010) identificó y evaluó la actividad antibiótica de los metabolitos termorresistentes presentes en el caldo de cultivo de *B. subtilis* 83 contra un hongo de *Fusarium* spp. En ensayos de antibiosis *in vitro*, el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo se obtuvo con compuestos de peso molecular menores a 5 KDa. Los compuestos debajo de este peso molecular fueron analizados por HPLC y se concluyó parcialmente que en el caldo de cultivo de *B. subtilis* 83 están presentes los metabolitos lipopeptídicos de la familia de la surfactina y de la iturina.

Posteriormente, Aragón-Gómez (2012) a través de análisis de amplificación por PCR y secuenciación de fragmentos cromosomales de *B. subtilis* 83 encontró que en el genoma de esta cepa están presentes los genes *srfAA*, *bmyD* y *mInA*, los cuales están involucrados en la síntesis de los lipopéptidos surfactina, bacilomicina D y el policétido macrolactina A, respectivamente. Adicionalmente, encontró una secuencia de 685 pb que mostró 98% de similitud con el gen *baeN* de *B. amyloliquefaciens* FZB42, gen involucrado con la síntesis del policétido bacilaeno.

Por otra parte, Luna-Bulbarela *et al.* (2018) aislaron, identificaron y caracterizaron (peso molecular (PM)), secuencia de aminoácidos y longitud de la cadena de ácido graso) el lipopéptido que produjo *B. velezensis* 83 (cultivada en medio mineral con glucosa como fuente de carbono) y que inhibió el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*. El caldo de cultivo fue centrifugado y recuperado para filtrarlo (ultrafiltración) y extraer los compuestos lipopeptídicos que produjo la bacteria. Se identificó que *B. velezensis* 83 produjo seis diferentes compuestos lipopeptídicos homólogos de la bacilomicina D: tres grupos isoméricos con PM de 1044, 1058 y 1072 Da, correspondientes a longitudes de cadena lipídica de 14, 15 y 16 carbonos, respectivamente. La diferencia del PM entre los homólogos (14 Da) es debido a la longitud de la cadena lipídica (adición de metileno, -CH<sub>2</sub>-) ya que

no se encontraron diferencias en la secuencia peptídica (Pro<sub>4</sub>-Glu<sub>5</sub>-Ser<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-(ácido graso-β-NH<sub>2</sub>)-Asn<sub>1</sub>-Tyr<sub>2</sub>-Asn<sub>3</sub>). Los seis homólogos presentaron actividad antifúngica, se observó que a mayor longitud de cadena lipídica se requiere menor concentración mínima inhibitoria (MIC) contra *C. gloeosporioides* y que el estado fisiológico celular (micelio o espóra) del hongo, es determinante para inhibir el crecimiento del hongo. Para los seis homólogos, las esporas requirieron MIC<sub>100</sub> específica (μM de bacilomicina D/g de biomasa inicial del hongo) de 100<550 μM/g, en contraste para el micelio, la MIC<sub>100</sub> específica fueron menor a 50 μM/g. Con el uso de tinción con yoduro de propidio, se observó que la exposición de las esporas a bacilomicina D (C14 A-1044 Da), afectó la viabilidad y el porcentaje de germinación de las esporas en función de la concentración del lipopéptido. La germinación fue menor al 5% cuando las esporas estuvieron expuestas a 27 μM de bacilomicina D (C14 A-1044 Da), en contraste, a esa misma concentración del lipopéptido, el micelio sufrió cambios morfológicos y fue visiblemente no viable. Adicionalmente, Luna-Bulbarela *et al.* (2018) reportaron que hubo sinergia entre dos homólogos de bacilomicina D (C14 A-1044 Da y C16 B-1072 Da) para inhibir el crecimiento *in vitro* del *C. gloeosporioides*.

El proceso actual para la producción de esporas de *B. subtilis* 83 es el cultivo en lote con medio mineral definido con glucosa y sulfato de amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Este proceso (transcurridas 40 h de cultivo) permite obtener densidad celular de 1 x10<sup>9</sup> cel/mL con 87% de esporulación, producción de surfactina (35 mg/L), bacilomicina (75 mg/mL) y metabolitos de sobreflujo de carbono como la acetoína+butanodiol (3.0 g/L) y el γ-PGA (2.2 g/L), siendo este último causante del incremento de viscosidad aparente (a 100 s<sup>-1</sup>) del caldo de cultivo, con la subsecuente limitación de transferencia de oxígeno (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2020). Debido a lo anterior, Cristiano-Fajardo *et al.* (2020) evaluaron estrategias de cultivo para *B. subtilis* 83 con la finalidad de producir esporas (principio activo de Fungifree AB®) con la mínima producción de metabolitos de sobreflujo de carbono manipulando la velocidad específica de consumo de glucosa (q<sub>gluc</sub>). Se encontró que en condiciones de cultivo continuo a un valor de D=0.06 h<sup>-1</sup> (15% de μ<sub>max</sub> para *B. subtilis* 83) y manteniendo el pH=6.8, se logró mantener baja la velocidad específica del consumo de glucosa (q<sub>gluc</sub> 1.3x10<sup>-13</sup><1.5x10<sup>-13</sup> g/cel h) y la concentración de glucosa fue cercana a 0 g/L. Esta condición de limitación de la fuente de carbono, favoreció la producción de alta densidad de células vegetativas (6 x10<sup>9</sup> cel/mL) de *B. subtilis* 83 de las cuales ~47% fueron esporas maduras, así como la baja producción de surfactina (<5 mg/L), bacilomicina (<20 mg/L), acetoína+butanodiol (<0.5 x10<sup>-13</sup>g/cel h) y γ-PGA (<0.1 x10<sup>-13</sup>g/cel h) en las primeras 16 h de cultivo continuo. En contraste, el cultivo continuo a D=0.25 h<sup>-1</sup> (65% de μ<sub>max</sub> para *B. subtilis* 83) y pH 6.8, *B. subtilis* 83 presentó mayor velocidad específica del consumo de glucosa (q<sub>gluc</sub> 8x10<sup>-13</sup><10x10<sup>-13</sup> g/cel h), en esta condición de cultivo se obtuvo menor concentración de células vegetativas (<4 x10<sup>9</sup> cel/mL), se favoreció la acumulación de glucosa y no se logró la esporulación de *B. subtilis* 83, adicionalmente, la producción de γ-PGA (1.2 x10<sup>-13</sup>g/cel h) causó problemas de transferencia de oxígeno en el medio de cultivo.

Los antecedentes han permitido considerar que la cepa identificada inicialmente como *B. subtilis* 83 (Fungifree AB®) tiene cercana relación filogenética con la cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 (RhizoVital®). Por lo tanto, *B. subtilis* 83 además de su uso como ACB podría actuar como PGPB. Sin embargo, hasta antes de este estudio no se había realizado aún la secuenciación del genoma de la cepa 83 para analizar el potencial genético (genes característicos de bacterias asociadas a plantas) que le permiten establecer relaciones benéficas con las plantas. Por otra parte, existen varios reportes de que la interacción entre los metabolitos y las células (que en el caso de bioproductos comerciales son esporas por su larga vida de anaquel) de las cepas de *Bacillus* da como resultado un

mejor control biológico. Debido a las características del proceso de producción de Fungifree AB®, el formulado contiene dos factores de antagonismo de *B. subtilis* 83 que son: 1) esporas (que al germinar serán células vegetativas activas como ACB o PGPB debido a la síntesis *de novo* de metabolitos relacionados con los mecanismos de antagonismo) y 2) metabolitos (producidos durante el cultivo de la bacteria). En este sentido saber cuál es el factor de antagonismo contenido en Fungifree AB® que tiene el principal efecto de control biológico es determinante para poder implementar, de una manera racional, mejoras al proceso de producción y formulación del producto comercial sin afectar de manera negativa su eficacia de control biológico.

### 3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 3.1. ¿Cuáles son las diferencias genéticas y fenotípicas entre *B. subtilis* 83 y *B. velezensis* FZB42 (cepa modelo de control biológico y como PGPR)?
- 3.2. ¿Cuál es la efectividad de control biológico que ejerce *B. subtilis* 83 contra *C. gloeosporioides* (antracnosis del mango) y de *B. cinerea* (moho gris en jitomate) y cuál es el principal factor de antagonismo (esporas o metabolitos) implicado en el control biológico de estos fitopatógenos?
- 3.3. ¿Cuál es el potencial de *B. subtilis* 83 como promotora del crecimiento de plantas?

### 4. HIPÓTESIS

#### HIPÓTESIS GENERAL

*B. subtilis* 83 tiene alta similitud genómica (ANI>97%) con *B. velezensis* FZB42, por lo tanto, es una cepa que tiene el potencial genético (genes característicos de bacterias asociadas a plantas) para establecer relaciones benéficas con las plantas a través de ejercer control biológico de fitopatógenos y de promover el crecimiento de plantas.

#### HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- *B. subtilis* 83 y *B. velezensis* FZB42 (anteriormente *B. subtilis* FZB42) son cepas de alta similitud genómica (ANI>97%), sin embargo, son fenotípicamente diferentes en términos de producción *in vitro* de metabolitos involucrados en los mecanismos de control biológico de fitopatógenos (p. ej. producción de surfactina, bacilomicina y  $\gamma$ -PGA) y en la promoción del crecimiento de plantas (p. ej. acetoina y 2,3-butanodiol).
- La eficacia biológica de Fungifree AB® se debe a las esporas viables de *B. subtilis* 83 que están contenidas en el formulado, ya que al desarrollarse como células vegetativas, realizan la síntesis *de novo* de metabolitos con los cuales inhiben a hongos fitopatógenos.
- *B. subtilis* 83 es capaz de actuar como una promotora del crecimiento de plantas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. GENERALES

- Comparar genotípicamente (a través de análisis del genoma) y fenotípicamente (producción *in vitro* de metabolitos) a *B. subtilis* 83 contra la cepa *B. velezensis* FZB42 (modelo de control biológico y PGPR) para determinar su potencial de control biológico y así como de promoción del crecimiento de plantas.
- Determinar cuál es el principal factor de antagonismo contenido en Fungifree AB® (esporas o metabolitos de *B. subtilis* 83) que ejerce el control biológico contra dos hongos fitopatógenos foliares (*C. gloeosporioides* y *B. cinerea*).
- Evaluar el efecto promotor de crecimiento de tratamientos con Fungifree AB® (*B. subtilis* 83) aplicados al sustrato de plantas de jitomate.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Anotar el genoma de la cepa bacteriana (*B. subtilis* 83) constituyente de Fungifree AB® y analizar (pangenoma, árbol filogenético, presencia ausencia de genes, comparación con otros genomas realizando ANI) para identificar los genes característicos de las cepas asociadas a plantas.
- Realizar ensayos *in vitro*, para determinar las diferencias fenotípicas de *B. subtilis* 83 en la producción de metabolitos relacionados con el control biológico (p. ej. producción de surfactina, bacilomicina y  $\gamma$ -PGA) y la promoción del crecimiento de plantas (p. ej. acetoína y 2,3-butanodiol) respecto a la cepa de *B. velezensis* FZB42.
- Evaluar la eficacia de Fungifree AB® para el control biológico del hongo *C. gloeosporioides* en ensayos *in vivo* (cultivo de mango) y determinar cuál es el principal factor de antagonismo implicado en la inhibición de este fitopatógeno en ensayos *in vitro*.
- Determinar cuál es el principal factor de antagonismo contenido en Fungifree AB® en el control biológico del hongo *B. cinerea* mediante ensayos *in vitro* con hojas y frutos de jitomate.
- Evaluar el efecto de Fungifree AB® como promotor de crecimiento vegetal en diferentes estados fenológicos del cultivo de jitomate (semilla, plántula y crecimiento vegetativo de la planta cultivada en invernadero).

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para contestar las preguntas de investigación de este proyecto se utilizó la siguiente estrategia:

### **¿Cuáles son las diferencias geno y fenotípicas la *B. subtilis* 83 con la cepa *B. velezensis* FZB42 (cepa modelo de control biológico y como PGPR)?**

Para iniciar el estudio de caracterización de *B. subtilis* 83 como ACB y como PGPB se realizó el análisis de su genoma completo: análisis del pangenoma, árbol filogenético, presencia ausencia de genes, comparación con otros genomas realizando ANI) para identificar los genes característicos de las bacterias asociadas a plantas. En particular, se realizó la comparación del genoma de *B. subtilis* 83 con la cepa *B. velezensis* FZB42. Seguidamente, se realizaron cultivos en escala de matraz, para conocer las posibles diferencias fenotípicas entre *B. subtilis* 83 y *B. velezensis* FZB42 con respecto a la producción de algunos de los metabolitos relacionados con los diferentes mecanismos de control biológico y de promoción del crecimiento vegetal (surfactina, bacilomicina,  $\gamma$ -PGA, acetoína y 2,3-butanodiol).

### **¿Cuál es la efectividad de control biológico que ejerce *B. subtilis* 83 contra *C. gloeosporioides* (antracnosis del mango) y de *B. cinerea* (moho gris en jitomate) y cuál es el principal factor de antagonismo (esporas o metabolitos) implicado en el control biológico de estos fitopatógenos?**

El estudio inició con el modelo de interacción *C. gloeosporioides*-mango-*B. subtilis* 83 (dado que fue el primer cultivo sobre el cual fue evaluado el control biológico de esta cepa). Sin embargo, en el transcurso de la investigación fue necesario establecer sistemas de interacción fitopatógeno-planta que permitieran realizar ensayos *in vivo* e *in vitro* (con obtención de resultados reproducibles y en corto tiempo), así que se complementó con otro sistema de interacción conformado por *B. cinerea*-jitomate-*B. subtilis* 83. Con el modelo de estudio *B. subtilis* 83 contra *C. gloeosporioides* (antracnosis) en mango, se realizó un ensayo *in vivo* para evaluar la eficacia de control biológico de Fungifree AB® (*B. subtilis* 83) contra *C. gloeosporioides*. Se aplicaron diferentes tratamientos de control biológico en etapa pre-cosecha en árboles de mango en un huerto comercial localizado en El Rosario Sinaloa, México. Con ensayos *in vitro* (ensayos de confrontación en medio PDA) se realizó la identificación del factor de antagonismo de Fungifree AB® con mayor contribución el control biológico de *C. gloeosporioides*. Para este tipo de ensayos, se utilizaron como tratamiento: 1) formulado con el factor “esporas” el cual solo contiene las esporas de *B. subtilis* 83 (esporas+soporte sólido), 2) formulado con el factor “metabolitos” el cual solo contiene el sobrenadante del cultivo de producción de esporas de *B. subtilis* 83 (sobrenadante+soporte sólido) y 3) formulado comercial Fungifree AB® (esporas+sobrenadante+soporte sólido). El tratamiento control fue el soporte sólido de la formulación de Fungifree AB®. Con el modelo de estudio *B. subtilis* 83 contra *B. cinerea* (moho gris) en jitomate (hojas y frutos), también se realizó la identificación del factor de antagonismo de *B. subtilis* 83 con mayor contribución el control biológico. Los tratamientos con los factores de antagonismo de Fungifree AB® fueron los mismos que los utilizados en los ensayos *in vitro* contra *C. gloeosporioides*. El área de la infección por el hongo sobre la hoja fue evaluada con análisis de imágenes, el área



de infección en los frutos fue evaluada midiendo el diámetro de la infección y ajustando el área de infección como una circunferencia. A partir de estos datos fue calculada la severidad de infección causada por *B. cinerea* y posteriormente la eficacia de control biológico de los tratamientos evaluados.

### **¿Cuál es el potencial de *B. subtilis* 83 como promotora del crecimiento de plantas?**

Para contestar esta pregunta de investigación fueron realizados ensayos *in vivo* aplicando tratamientos de *B. subtilis* 83 en diferentes etapas fenológicas del jitomate variedad Frodo: semilla, plántula y plantas cultivadas en invernadero. Primero, fue evaluado el efecto de la concentración de esporas de *B. subtilis* 83 en el sustrato que se utiliza para la producción de plántulas de jitomate. Se evaluaron dos modalidades de tratamientos: 1) aplicación desde la germinación de la semilla ó 2) aplicación en plántulas con 20 días de desarrollo, el tratamiento control fue el sustrato sin aplicación de bacteria. El efecto de los tratamientos fue evaluado realizando el seguimiento del crecimiento de las plántulas en términos de biomasa (peso seco) de raíz y de follaje. Posteriormente, fue evaluado el potencial de promoción del crecimiento de *B. subtilis* 83 sobre plantas de jitomate cultivadas en invernadero en las instalaciones de FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura) unidad Tezoyuca (Emiliano Zapata, Morelos, México). El testigo fue el tratamiento convencional utilizado en FIRA. Para evaluar el efecto de los tratamientos se realizó el registro de la producción y calidad de los frutos de jitomate durante la etapa de cosecha.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Caracterización genotípica y fenotípica de *B. subtilis* 83

#### 7.1.1. Análisis del genoma de *B. subtilis* 83 e identificación de genes relacionados con control biológico y promoción del crecimiento vegetal

El DNA genómico de *B. subtilis* 83 fue secuenciado por MOgene Genome Sequencing Services (Mogene LC; St. Louis, MO, EE. UU.) con las siguientes especificaciones: bibliotecas de 350 pb de tamaño de fragmento y secuenciación de extremos emparejados (2 x 250 pb) en un secuenciador MiSeq. El número total de lecturas fue de aproximadamente ~7,000,000 de lecturas emparejadas que representó una cobertura del genoma ~400X. El ensamblaje del genoma se realizó como ha sido descrito previamente (Pérez-Carrascal *et al.*, 2016). Primeramente, el ensamblaje se obtuvo a través de una combinación de un ensamblaje *de novo* y uno basado en referencias con el uso de Spades Genome Assembler (SPAdes; Bankevich *et al.*, 2012). Primero, utilizando NUCmer (Kurtz *et al.*, 2004), los *contigs* de SPAdes se alinearon con el genoma completo de *B. velezensis* YAU-B9601-Y2 ya que filogenéticamente, ésta resultó ser la cepa más cercana a *B. subtilis* 83 (Hao *et al.*, 2012). Posteriormente, las lecturas de Illumina se mapearon en el ensamblaje de *contigs*, se orientaron de acuerdo con sus *pair-ends reads* dirección 5'-3' y finalmente se unieron manualmente con ConSeq (Gordon *et al.*, 2013). Al final, se obtuvo un solo *contig* que representa un cromosoma circular cerrado de 3,997,902 pb de longitud. Las regiones de codificación de proteínas (ORFs) se predijeron con Glimmer 3.02 (Delcher *et al.*, 2007). El modelo de ORF se cargó en Artemis 12.0 (Carver *et al.*, 2012) para realizar rectificaciones de tramas de ORF y registrar anotaciones manuales. Las descripciones de función de los genes se obtuvieron mediante búsquedas BlastX del conjunto completo de ORFs en la base de datos no redundante del GenBank (Benson *et al.*, 2008). Se creó una tabla de mejores *hits* con los parámetros del porcentaje de identidad y similitud, la cobertura de los ORFs, las coordenadas de las coincidencias y la función anotada de la proteína. Las comparaciones adicionales con la base de datos de dominios conservados (CDD) del GenBank (Marchler-Bauer *et al.*, 2015), Interpro (Mitchell *et al.*, 2015) y la base de datos IS (Siguier *et al.*, 2006), contribuyeron a confirmar las anotaciones basadas en la información del GenBank, así como para resolver casos controvertidos. La anotación COG se realizó utilizando la base de datos COG del NCBI (Tatusov *et al.*, 2000) con comparaciones Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con una similitud mínima del 30% y un valor  $e < 1 \times 10^{-6}$ . La secuencia completa del genoma de *B. subtilis* 83 se depositó en GenBank con el número de acceso CP034203.

El análisis del genoma se realizó siguiendo la metodología descrita por González *et al.* (2019). En resumen, el modelo de pangenoma se obtuvo con el programa Bacterial Pangenome Analysis (BPGA), configurando el algoritmo de agrupamiento USEARCH en los valores predeterminados (la identidad mínima del 50% y 20 combinaciones) (Chaudhari *et al.*, 2016). El árbol filogenético se realizó en el programa de análisis evolutivo MEGA-6 (Tamura *et al.*, 2013) mediante el método de máxima verosimilitud (ML) utilizando la matriz JTT (Jones *et al.*, 1992) y *bootstrap* de 1,000 repeticiones.

El genoma accesorio obtenido con el programa BPGA, se representó en un mapa de calor de presencia y ausencia de genes y se esquematizó con heatmap.2 (paquete R's gplots; <https://rdrr.io/cran/gplots>). Las comparaciones del genoma se ilustraron mediante mapas circulares obtenidos con GenVision de DNASTAR (Lasergene Core Suite, <https://www.snapgene.com>). Las comparaciones del genoma completo se realizaron con cepas de *Bacillus* seleccionadas utilizando el valor ANI calculada con JSpecies (Richter *et al.*, 2016) y MUMmer 3.06 (Kurtz *et al.*, 2004). Las búsquedas de profagos se realizaron con el programa Phaster (Arndt *et al.*, 2016).

### **7.1.2. Diferencias fenotípicas entre *B. subtilis* 83 y *B. velezensis* FZB42 con respecto a la producción de metabolitos relacionados con la actividad de control biológico y promoción del crecimiento**

**Cultivos en lote.** Para realizar el análisis de la producción de metabolitos, las cepas *B. subtilis* 83 y *B. velezensis* FZB42 fueron cultivadas en medio líquido con la siguiente composición (en g/L): glucosa 30.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.98; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.6; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4; CaCl<sub>2</sub> 0.1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.08; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.019. Para el cultivo de cada cepa se inocularon 5 mL (2x10<sup>9</sup> ufc/mL) provenientes de un cultivo nocturno en medio YPG en matraces agitados de 500 mL con 100 mL de volumen de trabajo, se incubaron a 30°C y 200 rpm durante 48 h. Los cultivos se realizaron a un pH inicial de 6.8 ajustado con NaOH antes de la esterilización. Para *B. velezensis* FZB42, el cultivo por lotes en medio de cultivo líquido se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales utilizadas para *B. velezensis* 83. La concentración de células (células/mL) se determinó utilizando una cámara de Neubauer.

**Determinación de la concentración de glucosa, acetoína y 2,3-butanodiol.** Se tomó una muestra de 1 mL del cultivo y se eliminaron las células mediante centrifugación (10,000 xg por 15 min) y filtración a través de una membrana de 0.2 µm (hidrófila y no pirogénica, Sartorius AG, Goettingen, Alemania). La glucosa, la acetoína y el 2,3-butanodiol contenidos en el sobrenadante se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC) de alta resolución utilizando la metodología reportada previamente (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2020). Para el análisis se cargaron 20 µl de la muestra a analizar en una columna Aminex HPX-87H (7.8x300 mm; Bio-Rad Laboratories Inc., California, EE. UU.) y se separaron mediante un sistema HPLC Waters 2695 (Waters Corporation, Massachusetts, EE. UU.). La acetoína se determinó por absorbancia a 210nm y la glucosa y 2,3-butanodiol por índice de refracción (IR) (Waters 2414, EE. UU.). Como fase móvil se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM con un flujo de 0.6 mL/min. La temperatura de la columna se ajustó a 50°C. Se utilizaron como estándares glucosa pura, acetoína y 2,3-butanodiol (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EE. UU.).

**Determinación de la concentración de surfactina y bacilomicina D.** Se colectó una muestra de 1 mL de los matraces agitados y se eliminaron las células bacterianas del medio por filtración como se describió previamente. El sobrenadante se cargó en una columna Zorbax SB-C18 (4.6 mm x 150 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) y se separó por HPLC utilizando un sistema Waters 2695 HPLC. La fase móvil estuvo compuesta por ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% en agua (fase A) y TFA al 0.1% en acetonitrilo (fase B). Las muestras se eluyeron durante 14 min utilizando el 40% de la fase B a 32 °C con un flujo de 0.3 mL/min, seguido de un gradiente lineal

de 40-85% durante 1 min y mantenido al 85% durante otros 36 min; finalmente un nuevo gradiente lineal de 85-40% por 1 min, continuado al 40% por 8 min. El patrón de elución se controló determinando la absorbancia a 205nm. Se utilizaron como estándares surfactina e iturina A puras (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EE. UU.).

**Concentración de  $\gamma$ -PGA y peso molecular promedio.** La concentración de  $\gamma$ -PGA en el sobrenadantes y el PM promedio del polímero fueron determinados mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) utilizando la metodología reportada anteriormente (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2020). Brevemente, se cargaron 100  $\mu$ l de sobrenadante libre de células en columnas de Ultrahidrogel conectadas en serie (UG500/Linear; Waters Corporation, Massachusetts, EE. UU.) y acopladas a un sistema HPLC Waters 2695 conectado a un detector diferencial de índice de refracción, Waters 410. La elución se llevó a cabo empleando una solución de 0.1 M de  $\text{NaNO}_3$  a una temperatura de columna de 38°C y flujo isocrático de 0.8 mL/min. Se prepararon soluciones de un estándar comercial de  $\gamma$ -PGA (Sigma-Aldrich, USA) para la elaboración de la curva de calibración para realizar el análisis de concentración del polímero. El análisis de PM promedio del  $\gamma$ -PGA fue llevado a cabo con el *software* Empower 2 (Waters Corporation, Massachusetts, USA). Se utilizaron estándares de óxido de polietileno con pesos moleculares promedio entre 23 y 933 kDa para crear la curva de calibración para analizar el peso molecular.

## 7.2. Ensayos de control biológico de *B. subtilis* 83 *in vitro* e *in vivo*

### 7.2.1. Preparación de los formulados con los factores de antagonismo de *B. subtilis* 83

**Producción de polvos concentrados.** El proceso de producción de los polvos concentrados se realizó con una muestra de un cultivo desarrollado bajo las condiciones de proceso establecidas para la obtención de Fungifree AB® (cultivo industrial a escala de 20,000 L). La muestra fue centrifugada para la separación y recuperación de la biomasa (esporas) de *B. subtilis* 83 y el sobrenadante (para recuperar todos los metabolitos extracelulares que la bacteria produjo durante el cultivo industrial). La separación fue realizada en una centrifuga Sharpless a 12,000 rpm. La biomasa fue resuspendida y mezclada en solución salina (0.9% NaCl) para volverla a centrifugar con el objetivo de “lavar las esporas”. La biomasa recuperada y el sobrenadante fueron almacenados en refrigeración (4°C) hasta ser utilizados para preparar mezclas conformadas por 1) biomasa-soporte ó 2) sobrenadante-soporte para posteriormente preparar las formulaciones requeridas para los ensayos de control biológico. La biomasa fue mezclada con el soporte en la proporción necesaria para obtener un polvo concentrado de esporas que contuviera  $1 \times 10^{10}$  UFC/g. El sobrenadante fue mezclado con el soporte considerando utilizar el mismo volumen del cual fue recuperada la biomasa utilizada para el polvo concentrado de esporas. Posteriormente, la mezcla biomasa-soporte y sobrenadante-soporte fue sometida a un proceso de secado por aspersión en condiciones de 120 mL/min, 120°C temperatura de entrada-60°C temperatura de salida. Finalmente, se obtuvieron los polvos concentrados de “esporas” y de “metabolitos”.

**Producción de formulados para realizar los ensayos de inhibición *in vitro*.** Conforme se fue requiriendo durante el desarrollo de la investigación, el polvo concentrado que contenía solo “esporas” fue diluido con más soporte sólido para tener un formulado con  $1 \times 10^9$  UFC/g (como el formulado comercial Fungifree AB®). De igual forma, el polvo concentrado que contenía solo “metabolitos” fue diluido con más soporte sólido conservando la misma proporción (concentrado/soporte) con la que fue preparado el formulado de esporas.

**Determinación de UFC/g de producto formulado.** En un tubo Falcon de 50 mL se colocaron 0.1 g de producto formulado y se adicionaron 9.9 mL de una solución de glucosa al 10%. La suspensión fue agitada en vórtex por 1 minuto y posteriormente se mantuvo a 29°C y 200 rpm de agitación durante 2 h. La determinación de UFC/g de producto formulado se hizo con la técnica de dilución seriada y siembra en placa. El medio de cultivo utilizado fue YPG sólido (adicionado con 15 g/L de agar) y los cultivos fueron incubados a 32°C durante 12 horas para hacer la cuenta de UFC/mL de las células de la suspensión. Finalmente, se consideró la masa utilizada para hacer el cálculo de UFC/g de producto formulado.

### 7.2.2. Eficacia de *B. subtilis* 83 en el control biológico de *C. gloeosporioides* en ensayos *in vivo* (cultivo de mango)

Se realizó un ensayo de control biológico de la antracnosis del mango causada por *C. gloeosporioides* en un huerto de producción de mango en El Rosario, Sinaloa, México. Para el ensayo se estableció un diseño experimental de bloques al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones. La unidad experimental fue un árbol de mango Kent con más de 10 años de edad. En el diseño experimental, se incluyeron tres tratamientos de Fungifree AB® (*B. subtilis* 83) dos tratamientos químicos y un control (sin tratamiento) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Tratamientos evaluados en el ensayo de control biológico contra antracnosis en mango.

Tratamiento	Concentración (g/L)
Fungifree AB®	1
Fungifree AB®	2
Fungifree AB®	3
Captan 50 PH®	300
Cupravit hidro®	400
Control	-

Los tratamientos fueron aplicados al follaje con una mochila aspersora motorizada. Se aplicaron cuatro litros del tratamiento correspondiente una vez al mes sobre el follaje de cada árbol desde el inicio de la floración hasta la recolección de los frutos (seis aplicaciones en total). Se tomaron 12 frutos de cada unidad experimental y se almacenaron (en condiciones comerciales) durante 21 días, posteriormente se evaluó la severidad de la antracnosis en post-cosecha. La evaluación de la severidad y eficacia del control obtenida con cada tratamiento se realizó mediante una escala hedónica visual, donde: 0) frutos sanos, 1) manchas <2 mm, 2) <5%, 3) <12,5%, 4) <25%, 5) <50% y 6) >50% del área afectada en el fruto del mango. Los datos recolectados fueron transformados para obtener el porcentaje de severidad con la siguiente fórmula:

$$P = \left[ \frac{\sum n.v}{N.C} \right] \times 100$$

Donde:

P= severidad (%)

n= número de muestras por categoría

v= valor numérico de la categoría

N= número total de muestras

C= categoría más alta

A partir del porcentaje de severidad, la eficacia de control de cada tratamiento se calculó con la siguiente fórmula:

$$Eficacia (\%) = \left[ IT - \left( \frac{it}{IT} \right) \right] \times 100$$

Donde:

IT= severidad (%) en el control

it= severidad (%) en el tratamiento

### **7.2.3. Ensayos de inhibición *in vitro* con *C. gloeosporioides***

Con ensayos *in vitro*, se evaluó el efecto de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* con diferentes tratamientos utilizando suspensiones celulares preparadas con formulaciones de los factores de antagonismo contenidos en Fungifree AB® (esporas+metabolitos de *B. subtilis* 83) (Tabla 9). Los metabolitos fueron filtrados (filtro de 0.20 µm) para poder evaluar el efecto de inhibición de los metabolitos sin interferencia de las esporas residuales.

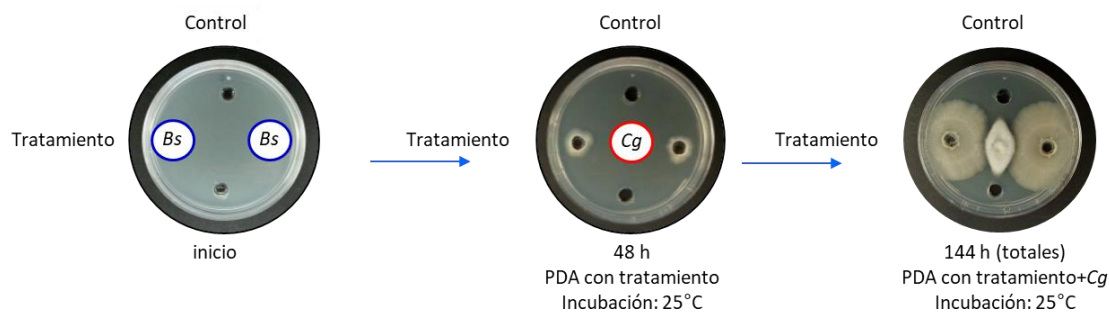
**Tabla 9.** Tratamientos con diferentes formulaciones de *B. subtilis* 83 contra *C. gloeosporioides* para ensayos de inhibición *in vitro*.

Tratamiento	Concentración (g/L)
Esporas de <i>B. subtilis</i> 83 (esporas+soporte sólido)	2
Metabolitos de <i>B. subtilis</i> 83 (sobrenadante+soporte sólido)	2
Fungifree AB® (esporas+sobrenadante+soporte sólido)	2
Control (soporte sólido)	2

Para los ensayos *in vitro*, se hicieron cuatro pozos con un sacabocados (diam. 6 mm) estéril en cuatro puntos equidistantes alrededor del centro de una caja de Petri con 25 mL de medio PDA, en pozos opuestos verticalmente se colocó al control, y en otros dos pozos opuestos horizontalmente se colocó al tratamiento. En cada pozo se colocaron 100 µL del control o del tratamiento a evaluar. En todos los ensayos se utilizaron 5 cajas por tratamiento y el ensayo se realizó por triplicado.

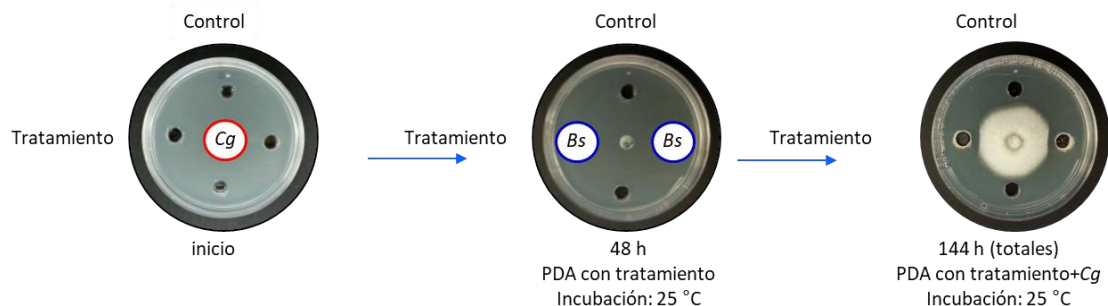
Se realizaron dos tipos de ensayos de inhibición *in vitro*:

- 1) Modo preventivo.** En esta modalidad las cajas fueron primeramente inoculadas con cada uno los tratamientos listados en la Tabla 9, se mantuvieron en incubación a 25 °C durante 48 h. Transcurrido ese tiempo, en el centro de la caja Petri, se colocó un explante de 6 mm de diámetro del hongo fitopatógeno con 7 días de crecimiento en PDA). Las cajas se mantuvieron nuevamente en incubación a 25 °C hasta 96 horas después de la inoculación del hongo (144 h totales en incubación) (Figura 5). Al cabo de ese tiempo, se comparó el crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del tratamiento y del control.



**Figura 5.** Ensayo de inhibición con diferentes formulaciones de *B. subtilis* 83 en modo preventivo contra *C. gloeosporioides*.

- 2) Modo curativo.** En esta modalidad en las cajas primeramente fue colocado un explante de 6 mm de diámetro del hongo fitopatógeno en el centro de la caja Petri. Las cajas se mantuvieron en incubación durante 48 h a 25 °C. Transcurrido ese tiempo, las cajas inoculadas con cada uno los tratamientos listados en la Tabla 9, y se mantuvieron en incubación a 25 °C hasta 96 horas después de la inoculación del tratamiento (144 h totales en incubación) (Figura 6). Al cabo de ese tiempo, se comparó el crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del tratamiento y del control.



**Figura 6.** Ensayo de inhibición con diferentes formulaciones de *B. subtilis* 83 en modo curativo contra *C. gloeosporioides*.

Para ambos tipos de ensayo, el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Crecimiento del hongo frente al pozo control}) - (\text{Crecimiento hongo frente al pozo del tratamiento})}{\text{Crecimiento del hongo frente al pozo control}}$$

#### 7.2.4. Ensayos de inhibición *in vitro* con *B. cinerea*

Con ensayos *in vitro*, se evaluó el efecto de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* con diferentes tratamientos (Tabla 10) utilizando suspensiones celulares preparadas con formulaciones de los factores de antagonismo de *B. subtilis* 83, incluyendo un tratamiento más que consistió en un fungicida químico.

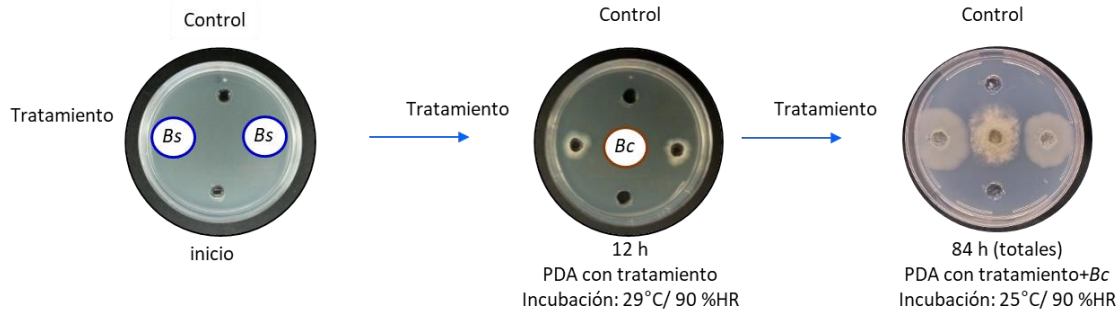
**Tabla 10.** Tratamientos con diferentes formulaciones de *B. subtilis* 83 contra *B. cinerea*.

Tratamiento	Concentración (g/L)
Esporas de <i>B. subtilis</i> 83 (esporas+soporte sólido)	2
Metabolitos de <i>B. subtilis</i> 83 (sobrenadante+soporte sólido)	2
Fungifree AB® (esporas+sobrenadante+soporte sólido)	2
Control (soporte sólido)	2
Clorotalonil (fungicida químico)	3

Para los ensayos *in vitro*, las cajas fueron preparadas como se describió previamente en la sección 7.2.3. Las cajas fueron incubadas durante 12 h a 29 °C, transcurrido este tiempo, en el centro de la caja Petri se colocó un explante de 6 mm de diámetro de *B. cinerea* (con 8 días de crecimiento en PDA a 25 °C) y las cajas fueron incubadas en oscuridad durante 72 horas post-inoculación de hongo a 25°C con 90 %HR (Figura 7). Al cabo de este tiempo se



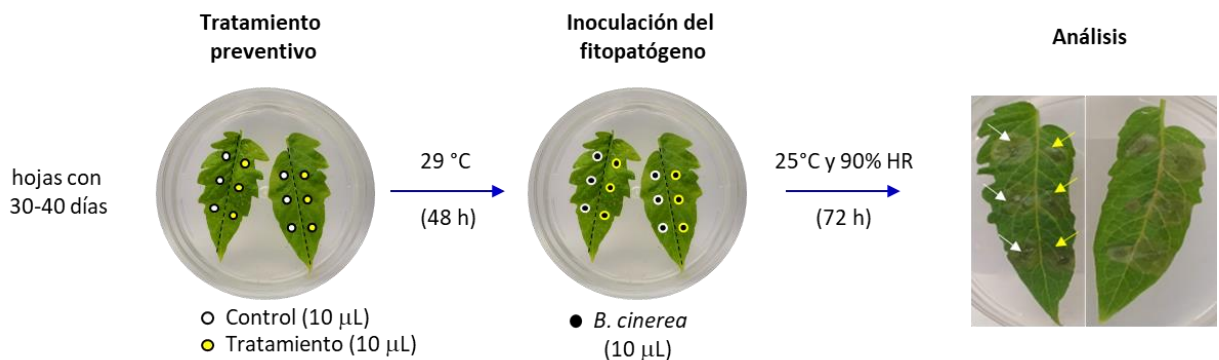
comparó el crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del tratamiento y del control. Se utilizaron cinco cajas de PDA por tratamiento. Se realizó el cálculo de la eficacia de inhibición (%) como se describió previamente.



**Figura 7.** Ensayo de inhibición con diferentes formulaciones de *B. subtilis* 83 en modo curativo contra *C. gloeosporioides*.

### 7.2.5. Ensayos de control biológico *in vitro* contra *B. cinerea* en hojas de jitomate

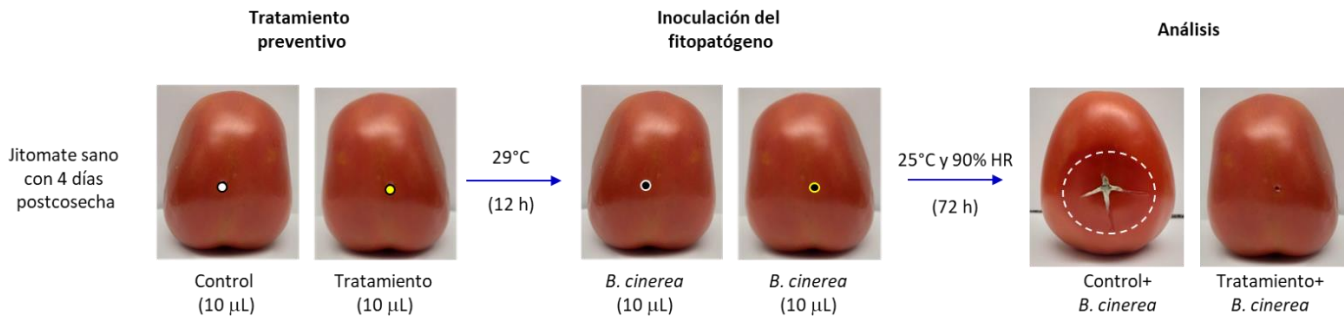
Los ensayos de control biológico se llevaron a cabo utilizando hojas de plántulas de jitomate con 30-40 días de crecimiento (Figura 8). Se colocaron tres hojas dentro de una caja Petri con sólo agar (para hacer un sistema que mantuviera alto %HR). Cada hoja fue dividida por la mitad (la nervadura de la hoja fue la división natural) y en cada mitad fueron aplicadas tres gotas de 10 µL del tratamiento (biológico o químico) o del control (Tabla 10). Una vez secas las gotas aplicadas, las cajas fueron selladas con Parafilm y colocadas en una incubadora (LabLine, EnvironCab 680) a 29 °C durante 48 h (considerando que en ese tiempo las esporas de la *B. subtilis* 83 germinaron sobre la hoja). Transcurrido ese tiempo de incubación, fueron aplicadas tres gotas de 10 µL de una suspensión con  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *B. cinerea* en cada lado de la hoja tratando de inocular en el mismo sitio de aplicación del control o de los tratamientos. Una vez secas las gotas (aprox. 10 min), las cajas fueron otra vez selladas con Parafilm para mantener el %HR en la caja Petri y envueltas con papel estraza para mantener las cajas en oscuridad. Finalmente, las cajas fueron guardadas en la incubadora (Heratherm iGS400, Thermo electro LeD GmbH) a 25 °C y 90 %HR durante 72 h. El área de infección fue medida a través de análisis de imágenes utilizando el programa Image ProPlus™ (Media Cybernetics, Rockville, USA).



**Figura 8.** Ensayos de control biológico *in vitro* de *B. subtilis* 83 contra *B. cinerea* en hojas de jitomate.

### 7.2.6. Ensayos de control biológico *in vitro* contra *B. cinerea* en frutos de jitomate

Para los ensayos de control biológico *in vitro* realizados con frutos se utilizaron tomates sanos con cuatro días post-cosecha (Figura 9). Para llevar a cabo el experimento se utilizaron 10 frutos por cada tratamiento. Todos los frutos fueron desinfectados superficialmente con cloro comercial (5 mL/L por 15 min) y lavados con agua estéril para retirar residuos de cloro, se dejaron secar en campana de flujo laminar. Una vez secos, cada fruto fue herido en dos puntos equidistantes utilizando un palillo estéril (una herida de 3 mm de profundidad). En una herida fueron aplicados 10 µL del tratamiento correspondiente y en la otra herida fueron aplicados 10 µL del control (Tabla 10). Posteriormente, los frutos fueron colocados cuidadosamente en vasos de precipitados (5 L) y fueron almacenados en una incubadora (Benchtop Environ-Cab 680, Lab-Line Instruments, Inc., IL, EE. UU.) a 29 °C durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, las heridas fueron inoculadas con 10 µL de suspensión de esporas de *B. cinerea*. Los jitomates se almacenaron nuevamente en los vasos de precipitados, finalmente se colocaron en una incubadora (Incubadora Heratherm iGS400, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EE. UU.) a 25 °C y 90% de HR durante 72 h. La infección fúngica en los frutos evaluó midiendo el diámetro (promedio del diámetro horizontal y vertical) de la herida en el fruto y luego se calculó el área de infección asumiendo una circunferencia.



**Figura 9.** Ensayos de control biológico *in vitro* de *B. subtilis* 83 contra *B. cinerea* en frutos de jitomate.

La eficacia de inhibición de la *B. subtilis* 83 contra *B. cinerea* en hojas y en frutos fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Eficacia (\%) = \left[ 1 - \left( \frac{it}{IT} \right) \right] \times 100$$

Donde:

IT= área de lesión por infección en la herida del control

it= área de lesión por infección en la herida con tratamiento

### 7.3. Promoción del crecimiento en jitomate: ensayos en laboratorio y ensayos en invernadero

Se realizaron ensayos de laboratorio y en invernadero para evaluar el efecto promotor de crecimiento que ejerce Fungifree AB® al aplicar suspensiones del formulado en diferentes concentraciones a diferentes estados fenológicos del cultivo de jitomate (semilla, plántula y crecimiento vegetativo de la planta).

#### 7.3.1. Ensayo en laboratorio para evaluar el potencial como promotor del crecimiento de plantas que ejerce Fungifree AB®

Para el ensayo de laboratorio, fueron sembradas semillas de jitomate variedad Frodo (Hybrid Tomato, ITSCO) en sustrato Sunshine M3 (previamente esterilizado a 121 °C/30 min) en charolas para germinación y se mantuvieron en un cuarto de cultivo con condiciones controladas a 25 °C, fotoperiodo 18 h luz/6 h oscuridad. Desde la aparición de la primera hoja verdadera fueron regadas con una solución Hoagland (1/4) conforme los requerimientos de la plántula (aprox. cada 48 h). El periodo de permanencia de las plántulas en la charola fue de 28 días (respetando las condiciones de producción comercial de plántulas para cultivo en invernadero).

Se evaluó el efecto de Fungifree AB® (*B. subtilis* 83 como PGPB) en dos modalidades de tratamientos al aplicar a el producto al sustrato: 1) desde la germinación de la semilla o en 2) plántulas con 20 días de desarrollo (DD). Se utilizaron 20 semillas o 20 plántulas por tratamiento. Los tratamientos fueron  $10^6$ ,  $10^4$  o  $10^2$  UFC/g sustrato y un control (sin tratamiento). El efecto sobre la plántula fue evaluado en términos de crecimiento como biomasa (peso seco 80°C/48 h) de raíz y de follaje. Con los resultados de este ensayo se seleccionó la concentración de producto que sería utilizada para la aplicación al sustrato de las plantas cultivadas en invernadero. En este ensayo, también se evaluó el establecimiento de la población de la *B. subtilis* 83 en la raíz de plántulas de jitomate a través del uso de una técnica de detección y cuantificación por qPCR. Se diseñaron los oligonucleótidos con el *software* Primer Express versión 2.0 a partir de una secuencia altamente específica en la región del gen *yomR* de *B. subtilis* 83. La extracción del DNA se llevó a cabo con rompimiento celular con nitrógeno. Para la reacción se utilizó SYBR Green I y se incluyó en el método una curva de desnaturalización para descartar amplificación inespecífica. Se realizó el estudio estadístico del crecimiento de la plántula y del establecimiento de la población en función del tratamiento utilizando ANOVA y prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### 7.3.2. Detección de UFC de *B. subtilis* 83 en plántulas de *A. thaliana*

Para detectar la población de *B. subtilis* 83 en raíces de plántulas de tomate a los 28 días, se cuantificó la población de *B. subtilis* 83 mediante análisis qPCR, para ello se realizaron dos curvas del Cq:

**Curva estándar (Cq vs log [DNA]):** elaborada para evaluar la eficiencia de amplificación (E) de los oligonucleótidos diseñados para la identificación del DNA de *B. subtilis* 83. Para obtener el DNA de las células *B. subtilis* 83, se incubó un cultivo de la cepa en frascos de 250 mL con 50 mL de medio YPG, durante 12-15 horas a 29 °C y 200 rpm (incubadora refrigerada Innova 4330, New Brunswick Scientific, Edison, Nueva Jersey, EE. UU.). Pasado este tiempo, se tomó 1.0 mL del cultivo y se centrifugó (centrífuga 5810 R, Eppendorf Hamburg, Alemania) a 10,000 rpm (rotor F45-30-11 Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) durante 3 min, dando como resultado 100 µL del sobrenadante y el sedimento celular en el vial de centrifugación. Posteriormente, se añadieron a las muestras 100 µL de lisozima (10 mg de lisozima Sigma-Aldrich en 1 mL de solución amortiguadora TE pH 8.0 Sigma-Aldrich). Posteriormente, esta mezcla se incubó a 37 °C durante 45 min (termomezclador modelo R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Una vez que la muestra estuvo a temperatura ambiente, se extrajo el DNA bacteriano con el método cloroformo-fenol (Moore y Dowhan, 2002). Para la amplificación del DNA se diseñaron los marcadores moleculares *yomR*-Bs83F/*yomR*-Bs83R con el *software* Primer Express versión 2.0, partiendo de una secuencia de 221 pb de la región del gen *yomR* de *B. subtilis* 83; esta secuencia fue seleccionada por ser la de menor identidad con el gen *yomR* de otras cepas de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* mediante análisis Blastn. Los oligonucleótidos *yomR*-Bs83 (*yomR*-Bs83F: ATGAAACAGCTGCCGGAGC/*yomR*-Bs83R: CTGCCCTGCATTCCATTTGT) se utilizaron como una mezcla contenida en una concentración de 5 µM cada uno. El control (NTC) fue una reacción de mezcla sin DNA. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado en un equipo termociclador (Thermal Cycler model C1000, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA). Se obtuvo una curva estándar de amplificación (Cq vs log [DNA]) para estos oligonucleótidos con un rango dinámico de trabajo de 60.0 a 0.0006 ng/µL de DNA ( $y = -3.3793x + 20.255$ ;  $r^2 = 0.9993$  y eficiencia de amplificación (E) de 97.7%). El límite de detección es de 0.0006 ng/µL en el Cq 31. El Cq del NTC fue 37.

**Curva estándar (Cq vs log [UFC]):** elaborada para cuantificar las UFC/raíz de *B. subtilis* 83, para ello primero se hizo un cultivo de la bacteria y se realizaron diluciones seriadas para obtener suspensiones celulares con diferentes concentraciones en el rango de  $10^9$ - $10^1$  CFU/mL. Con el método de conteo en placa se determinó el valor de UFC/mL de estas suspensiones. Asimismo, se realizó la extracción de DNA a partir de 1.0 mL de las mismas suspensiones celulares con el método cloroformo-fenol. Cabe mencionar que con suspensiones de concentraciones teóricas por debajo del orden de 10 UFC/mL, las UFC de la bacteria no pudieron ser detectadas con el método de conteo en placa. El rango dinámico de trabajo fue de  $4.8 \times 10^7$  CFU/mL ( $4.8 \times 10^5$  CFU/reacción) a  $3.5 \times 10^2$  CFU/mL (3.5 CFU/reacción), y  $y = -3.3266x + 42.35$  con  $r^2 = 0.992$  y E=99.8%. Por tanto, el límite mínimo de detección con oligonucleótidos *yomR*-Bs83 F/R fue de  $3.5 \times 10^2$  UFC/mL en el Cq 33, lo que correspondería a una concentración de 0.00012 ng de DNA de *B. subtilis* 83. El control (NTC) fue una reacción de mezcla sin DNA. Las muestras se analizaron por triplicado en el termociclador. El Cq del NTC fue de 37. Para detectar la población de *B. subtilis* 83 en las raíces de las plántulas, se utilizó toda la raíz de cada plántula cultivada durante 28 días en una bandeja de germinación. Se registró el peso húmedo de la raíz y posteriormente la raíz se sometió a un proceso de lavado por sonicación (3 min, Branson Ultrasonics M3800 Thermo Fisher Scientific, USA) en un tubo Corning de 10 mL que contenía 5 mL de agua desionizada. De esta suspensión celular se tomó 1 mL y se utilizó para la disrupción celular de las células bacterianas realizando 3 ciclos de congelación-calentamiento colocando el tubo en nitrógeno líquido (1 min)-agua caliente (3 min, 55 °C, termomezclador modelo R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Se utilizó un volumen de reacción de 10 µL usando el reactivo SYBR Green I (SYBR 5 µL, agua 3 µL,

mezcla de oligonucleótidos 1  $\mu$ L, muestra de DNA 1  $\mu$ L). El control (NTC) fue una reacción de mezcla sin DNA. Las muestras se analizaron por triplicado en el termociclador. El Cq del NTC fue de 37. Finalmente, se calculó la población de *B. subtilis* 83 mediante la ecuación  $y = -3.3266x + 42.35$  obtenida de la curva estándar de Cq vs log [UFC], el resultado se multiplicó por 5 (el agua volumen utilizado para el proceso de lavado de raíces) y reportado como UFC/raíz.

### 7.3.3. Ensayo en invernadero

Para el ensayo en invernadero (Balderas-Ruíz *et al.*, 2021), las plántulas utilizadas fueron inoculadas con *Azospirillum brasilense* desde el primer día de siembra de la semilla en la charola de germinación. La inoculación con *A. brasilense* es la práctica convencional utilizada por FIRA para que en 21 días puedan obtenerse plántulas del tamaño recomendado para el trasplante a macetas dentro del invernadero. Se utilizaron macetas de 15 L con una mezcla de sustrato a base de fibra de coco:tezontle (30:70), colocando dos plántulas en cada maceta. La densidad del cultivo en el invernadero fue de 2.8 plantas/m<sup>2</sup>, con 34 macetas por tratamiento. El cultivo tuvo un ciclo (de invierno) de 150-160 días. En el ensayo, se aplicaron dos tratamientos bioestimulantes con Fungifree AB<sup>®</sup> considerando las UFC de *B. subtilis* 83: 1) alta o 2) baja concentración de UFC/planta complementados con aplicación foliar de *B. subtilis* 83 (Tabla 11). Estos tratamientos se aplicaron por *drench* (100 mL) en el sustrato cercano al sistema radicular, desde el inicio (02 de octubre de 2017, siendo el día del trasplante de plántulas) hasta el final (02 de marzo de 2018) del ciclo de cultivo de tomate en invernadero con el fin de cubrir todas las etapas fenológicas de la planta de tomate, por lo tanto las plantas tuvieron seis aplicaciones de tratamiento de sustrato *B. subtilis* 83 (aplicadas los días 25, 50, 75, 100, 125 y 150 después del trasplante de plántulas). Los tratamientos biológicos también incluyeron la aspersion foliar de *B. subtilis* 83, así que se realizaron diez aplicaciones de aspersion foliar de *B. subtilis* 83 (aplicadas los días 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126 y 140 después del trasplante de plántulas). El volumen de la aspersion foliar de *B. subtilis* 83 se fue incrementando durante el experimento dependiendo del crecimiento de las plantas en el invernadero con el fin de humedecer todo el follaje de cada planta incluida en el experimento. A las plantas se les aplicó un mínimo de 2 L/tratamiento (33 mL/planta) al inicio del experimento y 4 L/tratamiento (66 mL/planta) al final, por lo que con un cálculo teórico se estimó que se aplicó un mínimo de  $6.7 \times 10^7$  UFC/planta y un máximo de  $1.3 \times 10^8$  UFC/planta. El control fueron plantas sin inoculación bacteriana (sin tratamiento biológico al sustrato ni al follaje) pero con aplicación de fungicidas químicos (Previcur energy<sup>®</sup> de Bayer Crop Science, Alemania y Velsul 725<sup>®</sup> de Velsimex, México) como tratamiento preventivo. Los químicos se aplicaron una sola vez en el ciclo de cultivo del tomate (siete días después del trasplante de las plántulas). Las variables vegetativas del crecimiento del tomate como altura (cm) y diámetro del tallo (cm) se midieron de 40 a 90 días después del trasplante, este intervalo de tiempo se consideró para cubrir la fase de crecimiento vegetativo de la planta. El diámetro se midió en el primer centímetro de la base del tallo. Las variables productivas fueron el número de frutos por planta y peso de fruto por planta. Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la calidad de los frutos cosechados, éstos fueron clasificados de acuerdo con su peso en: primera ( $\geq 100$  g), segunda ( $60 \leq 99$  g) y tercera ( $\leq 59$  g) calidad. La cosecha de tomate duró 65 días (del 30 de diciembre 2017 al 20 de marzo de 2018), los frutos se recolectaron cada tres o cuatro días. A partir de los registros de la cosecha de jitomate, se realizó el cálculo de la producción promedio de jitomate (kg/planta) y a partir de este dato se estimó la productividad anual (T/m<sup>2</sup>/año) con el supuesto de dos ciclos de cultivo completos al año.

**Tabla 11.** Tratamientos usados en plantas de jitomate crecidas en invernadero.

Tratamiento	Ingrediente activo	Concentración	Intervalo de aplicación
Fungifree AB®	<i>B. subtilis</i> 83	1x10 <sup>6</sup> UFC/planta	Sustrato (cercano a la raíz) cada 25 días
Sustrato baja		+	+
+foliar		6.7x10 <sup>7</sup> < 1.3x10 <sup>8</sup> UFC/planta	Aspersión foliar (al follaje) cada 14 días
Fungifree AB®	<i>B. subtilis</i> 83	1x10 <sup>8</sup> UFC/planta	Sustrato (cercano a la raíz) cada 25 días
Sustrato alta		+	+
+foliar		6.7x10 <sup>7</sup> < 1.3x10 <sup>8</sup> UFC/planta	Aspersión foliar (al follaje) cada 14 días
Control	<b>Fungicidas químicos</b>	Previcur energy® (0.5 mL/L) Velsul 725® (3 mL/L)	Aspersión foliar (al follaje)

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Minitab™ 17 Statistical Software (Minitab, LLC, Pennsylvania, EE. UU.). Para estos datos, se realizó la prueba de normalidad de la distribución de datos se realizó con el método de Kolmogorov-Smirnov ( $\alpha=0.05$ ) y la prueba de igualdad de varianzas con el método de Bartlett ( $\alpha=0.05$ ). Dado que los datos tuvieron distribución normal pero no la homocedasticidad (igualdad de varianzas) requerida para aplicar una prueba ANOVA, se ejecutó la prueba de Welch ( $\alpha=0.05$ ) asumiendo muestras sin varianzas iguales, seguida por la prueba Post-Hoc con el método de Games-Howell ( $\alpha=0.05$ ).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Análisis del genoma de *B. subtilis* 83 y diferencias fenotípicas con *B. velezensis* FZB42 (modelo de control biológico y como PGPR)

El genoma completo de *B. subtilis* 83 contiene 3,997,902 pb con un G+C del 46%, 7 copias del operón rRNAs (RNA 16S, 23S y 5S) y 68 genes tRNA. Se predijo que el genoma contiene 3,752 secuencias codificantes (CDS) de las cuales 3,255 fueron anotadas funcionalmente, mientras que 497 fueron hipotéticas. Se asignó un total de 2,892 CDS a los COG. Las clases funcionales definidas por los COG indican que *B. subtilis* 83 alberga una alta proporción de proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de carbohidratos (COG G) y aa (COG E), así como en la transcripción (COG K). Según el análisis filogenético del gen ribosomal 16S, la cepa 83 fue clasificada inicialmente como *B. subtilis* (Galindo *et al.*, 2013). Para revisar esta clasificación se realizó la comparación del genoma completo entre *B. subtilis* 83 y otras especies de *Bacillus* utilizando el valor (ANI) (Richter *et al.*, 2016). Los resultados indicaron que el genoma de la cepa 83 está estrechamente relacionado con el de *B. velezensis* (ANI > 97%) y que tiene identidad genómica del 98% con la cepa *B. velezensis* FZB42. Para respaldar esta observación, se realizó un análisis filogenómico utilizando 20 genes centrales de mantenimiento determinados a partir del análisis de pangenoma de 27 cepas de *B. velezensis* (incluida la cepa 83). El árbol filogenético, ubicó a la cepa 83 junto a las cepas de *B. velezensis*, *Bacillus methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, en un clado muy relacionado que forma la especie recientemente identificada como *B. velezensis* (Dunlap *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017). Estos resultados apoyan la filiación genética de la cepa 83 dentro de la especie *B. velezensis* que permite corregir la clasificación anterior. Con base en estos resultados, a partir de esta sección, en este documento se referirá a *B. subtilis* 83 como *Bacillus velezensis* 83. Estos resultados fueron integrados en el artículo reportado por Balderas-Ruíz *et al.* (2020). En el genoma de *B. velezensis* 83 fueron identificados los genes (Tabla 12) característicos de las bacterias asociadas a plantas de acuerdo con el criterio establecido por Borriss *et al.* (2011), y adicionalmente, se encontraron otros genes implicados en diferentes procesos de interacción bacteria-planta como la formación de la biopelícula, la ISR y la promoción de crecimiento. Además, fueron encontrados los genes de tres diferentes vías para la síntesis de la auxina IAA descritas por Idris *et al.* (2007): 1) vía indol-3-piruvato (IPA) dependiente del grupo de genes *patB*, *yclC* e *yclB*, 2) vía indol-3-acetonitrilo (IAN) en el que actúa el producto del gen de la nitrilasa (*yhcX*), y 3) vía de biosíntesis de IAA no caracterizada en la que participa el producto del gen de la acetiltransferasa (*ysnE*). Como se esperaba, también fueron encontrados en el genoma de *B. velezensis* 83 todos los genes implicados en las diferentes etapas del proceso de esporulación (vía SpoA) descrito por otros autores (Romero, 2013; López y Kolter, 2010; Tan y Ramamurthi, 2013). La capacidad de esporulación del género *Bacillus* es una característica muy importante que ha sido aprovechada por la industria de bioplaguicidas para la preparación de formulaciones en polvo debido a que las esporas son más fáciles de manipular y almacenar, presentando una vida útil más larga en comparación con las preparaciones líquidas.

Un análisis Blastp (cobertura del 70% con identidad del 50%) entre los genomas de *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42 mostró que estas dos cepas comparten 3475 genes centrales. En el genoma de *B. velezensis* 83 hay 371 genes únicos de los cuales el 57% son genes de proteínas con función conocida, 40% son proteínas hipotéticas,

3% son secuencias de fagos y 1% genes de enzimas cinasa. Por otro lado, en el genoma de *B. velezensis* FZB42 fueron identificados 262 genes únicos.

**Tabla 12.** Genes para la síntesis de metabolitos relacionados con la actividad de control biológico e interacción con plantas identificados en *B. velezensis* 83.

Metabolito	Cluster	Función
<b>Lipopéptidos sintetizados vía no ribosomal (<i>spf</i>-dependientes)</b>		
Surfactina*	<i>srfAABCD</i>	Antibacterial
Bacilomicina*	<i>bmyCBAD</i>	Antifúngico
Fengicina*	<i>fenEDCBA</i>	Antifúngico
Bacilibactina*	<i>bhbFBECA</i>	Sideróforo
<b>Policétidos sintetizados vía no ribosomal (<i>spf</i>-dependientes)</b>		
Macrolactina*	<i>mlnABCDEFGH</i>	Antibacterial
Bacilaeno*	<i>baeBCDE, acpK, bacGHIJLMNRS</i>	Antibacterial
Dificidina*	<i>dfnMLKJIHGFE DCBXYA</i>	Antibacterial
<b>Enzimas para metabolismo de carbohidratos</b>		
Xilanasa*	<i>xynACD</i>	Metabolismo de carbohidratos
Celulasa*	<i>bgIC</i>	
Amilasa*	<i>amyE</i>	
<b>Otros metabolitos de importancia</b>		
Amylociclicina	<i>acnFEDCAB</i>	Antibacterial
Bacilisina	<i>bacEDCBA</i>	Antibacterial antifúngico
Compuesto nematicida	<i>purEKBCSQLFMNHD</i>	Nematicida
Acetoína/2,3-butanodiol	<i>alsDCR</i>	ISR
Exopolisacárido	<i>epsA-O</i>	Biopelícula
Fibra proteica TasA	<i>yqxM-sipW-tasA</i>	Biopelícula
Polímero $\gamma$ -PGA	<i>pgdS, pgsEACB</i>	Biopelícula
Levansucrasa	<i>sacB</i>	Biopelícula
Bacilopeptidasa F	<i>bpr</i>	Biopelícula
Glutamil endopeptidasa	<i>mpr</i>	Proteasa
Serina proteasa	<i>epr</i>	Proteasa
Bacilolisina	<i>npr</i>	Proteasa
Serina proteasa extracelular	<i>vpr</i>	Proteasa
Fitasa (fosfatasa)	<i>phy</i>	Solubilización de fosfato
Ácido Indol Acético (IAA)		Promotor de crecimiento de plantas
Vía indol-3-piruvato	<i>patB, yclC, yclB, dhaS</i>	
Vía indol-3-acetonitrilo	<i>yhcX</i>	
Vía no caracterizada	<i>ysnE</i>	

(\*) Estos metabolitos son característicos de las bacterias asociadas a plantas (*B. amyloliquefaciens* sub. *plantarum*) según el criterio de Borriss *et al.* (2011), las cuales ahora están reclasificadas como *B. velezensis* (Dunlap *et al.*, 2015; Dunlap *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2017).

Entre los genes de función conocida fue en *B. velezensis* 83 identificado el *cluster cystTWA* (sulfato permeasa) y el gen *sbp* (proteína de unión a sustrato) que conforman el sistema ABC para transporte (importación y exportación a partir de la hidrólisis de ATP) de sulfato, estos genes proporcionan a las bacterias la capacidad de asimilar sulfato y/o tiosulfato como fuentes de azufre (Guédon y Martin-Verstraete, 2006). Los genes *cystTWA*, *sbp* y *cysP* (que



conforman un transportador de tiosulfato) participan en la vía de síntesis del aminoácido cisteína que sólo ha sido reportada para la cepa *B. subtilis* BD170, otras cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Mansilla y de Mendoza, 1997). La cisteína es un aminoácido presente en péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal como las bacteriocinas (Abriouel *et al.*, 2011) y otros péptidos como subtilisina (Graycar *et al.*, 2013). Sin embargo, *B. velezensis* 83 mostró algunos operones incompletos. Por ejemplo, en el operón para la síntesis de subtilina (*spa*) están presentes solo cinco genes (*spaEFGRK*) de diez reportados; los genes faltantes están involucrados en la síntesis y transporte de subtilina (Stein *et al.*, 2002). El operón para la síntesis de mersacidina (*mrs*) también estuvo incompleto, ya que sólo se encontraron cinco genes (*mrsK2*, *mrsR2*, *mrsFGE*) de los diez reportados; los genes esenciales para la síntesis de mersacidina (*mrsA* y *mrsR1*), los genes para la modificación postraducciona (*mrsM* y *mrsD*) y la exportación (*mrsT*) de este lantibiótico están ausentes, mientras que están presentes los involucrados en la regulación (*mrsK2*, *mrsR2*, *mrs1*) e inmunidad (*mrsFGE*) celular para este compuesto (Schmitz *et al.* 2006). Por lo tanto, se sugiere que *B. velezensis* 83 no lleva a cabo la síntesis de estos compuestos antimicrobianos de origen ribosomal. Algunas cepas de *Bacillus* spp. también producen VOC que contienen azufre, como el disulfuro de carbono, dimetiltrisulfuro y tiofeno, que han sido reportados tener actividad antifúngica (Caulier *et al.*, 2019). En conclusión, se desconoce la participación del transportador de tiosulfato en *B. velezensis* 83.

Otros genes relevantes como los de la feromona *comX*, tres proteínas rap (*rapK1*, *rapK2* y *rapH*) y un péptido Phr (*phrK*), también fueron identificados como genes únicos en *B. velezensis* 83. La importancia de estos genes radica en que dentro del grupo *B. subtilis*, la feromona ComX determina el ferotipo de cada cepa y ésto en la comunicación célula-célula para establecer estructuras comunitarias y la activación de diferentes programas genéticos dentro de y entre la biopelícula (Kalamara *et al.*, 2018).

La feromona ComX es la primera señal que activa el factor de transcripción ComA el cual regula la expresión de varios genes implicados en la red de transducción de señales del proceso de competencia y esporulación de la célula (Schultz *et al.*, 2009), así como en la producción de surfactina, bacilomicina, exoproteasas y matriz extracelular, que en conjunto dan lugar a la formación de biopelículas (Kalamara *et al.*, 2018). Se sabe que ComX puede ser diferente aún para las cepas de la misma especie, como por ejemplo en algunas cepas de *Bacillus* spp. aisladas de rizoplano de plantas de tomate, las cuales además causaron diferente efecto de promoción del crecimiento sobre las plantas (Oslizlo *et al.*, 2015).

Respecto a las proteínas Rap se clasifican en dos grupos, en uno se agrupan las que tienen actividad fosfatasa (RapA, RapB, RapE, RapH y RapJ) sobre reguladores de respuesta de efectores (RR) y en el otro las que ejercen su función bloqueando la actividad de unión al DNA (RapC, RapF, RapG, RapH y RapK) de su objetivo RR. Cada proteína Rap es inhibida específicamente por un péptido Phr (Gallego del Sol y Marina, 2013). La proteína RapH regula negativamente la expresión de *srfA* en *B. velezensis* MT45 y *B. velezensis* DSM7 (Zhi *et al.*, 2017) y el complejo RapK-PhrK regula la expresión de varios genes se sabe que se activan directamente por ComA (genes de competencia-esporulación) e indirectamente por Spo0A (genes de biopelícula-esporulación) (Auchtung *et al.*, 2006). De esta forma, es probable que aun la identidad genómica (ANI>98%) de las cepas *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42, se encuentren diferencias fenotípicas importantes en términos de control biológico y de la interacción con plantas, debido principalmente, a diferencias en la regulación de genes dependientes del QS (ComX, Rap-Phr).

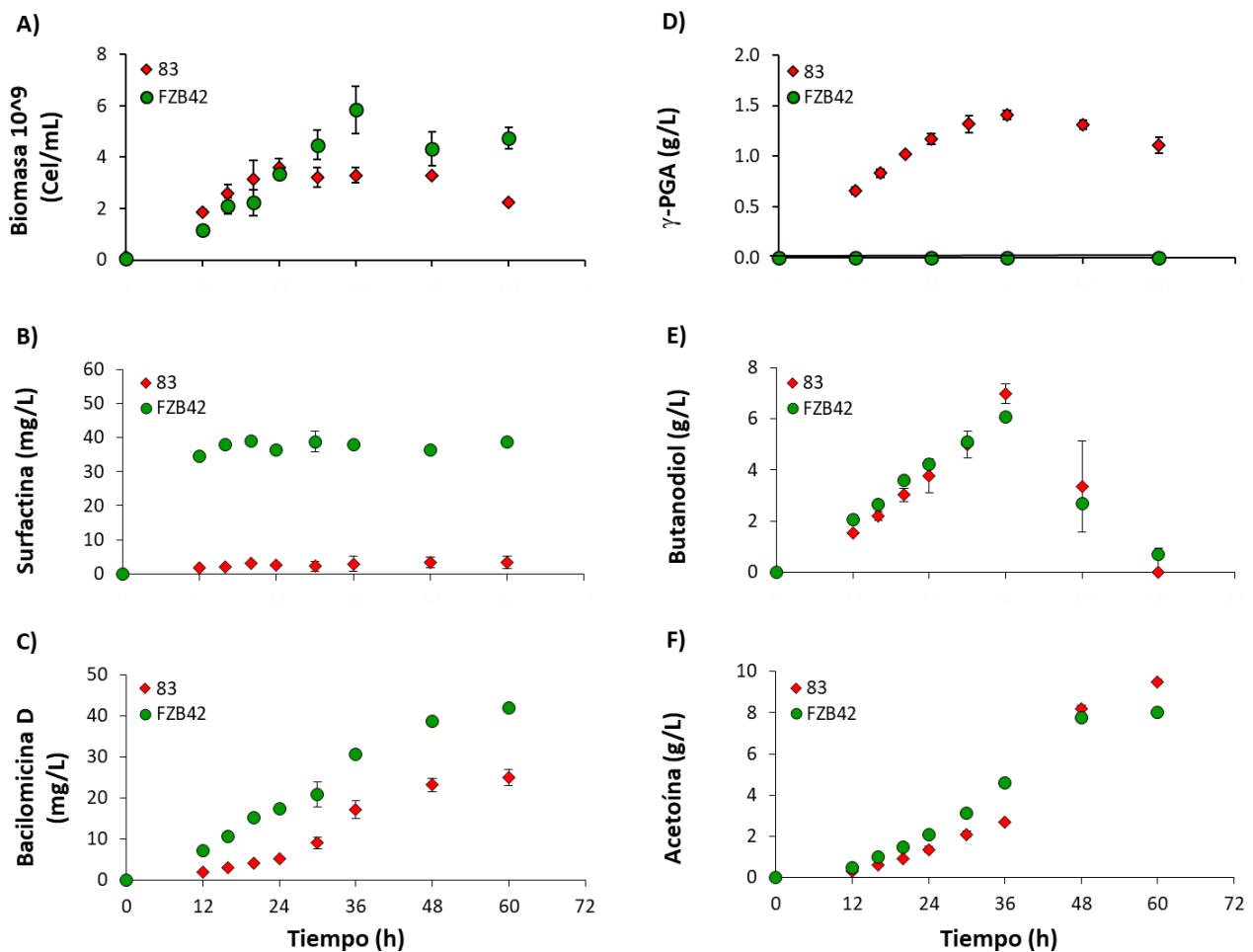
Para conocer las diferencias fenotípicas y la funcionalidad de algunos grupos de genes de *B. velezensis* 83 que codifican la síntesis de metabolitos relacionados con el control biológico y para la interacción con plantas (Figura 10), fueron realizados cultivos en matraces agitados. En las condiciones de cultivo utilizadas para este estudio, se observó que *B. velezensis* 83 alcanzó una biomasa máxima de  $3.3 \times 10^9$  células/mL (Figura 10A), la fase de crecimiento estacionario comenzó después de que se agotaron la glucosa (a las 36 h) y el acetato (a las 30 h) en el medio de cultivo (Anexo A, Figura A1-1). La producción de surfactina y bacilomicina D fue detectada desde las 12 h de cultivo, y en ambos casos, la producción de estos metabolitos estuvo asociada al crecimiento de la bacteria (ambas cepas mostraron la misma velocidad de crecimiento  $0.02 \text{ h}^{-1}$ , Anexo A, Figura A1-2). *B. velezensis* 83 produjo hasta 3.4 mg/L de surfactina (Figura 10B) y 23.2 mg/L de bacilomicina (Figura 10C). El  $\gamma$ -PGA fue producido entre las 12 y las 36 h de cultivo, la concentración máxima del polímero fue de 1.4 g/L (Figura 10D) y estuvo asociada con el aumento de la viscosidad aparente (3.9-4.9 cp) en el medio (Anexo A, Figura A1-1). El PM promedio del  $\gamma$ -PGA fue 1.8-2.0 MDa, pero este compuesto se consumió después del agotamiento de glucosa en el medio de cultivo (Anexo A, Figura A1-1). Otras pocas cepas de *Bacillus* (*B. subtilis* C10, *Bacillus licheniformis* A13, *B. licheniformis* TISTR 1010, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis* NX2 y *B. amyloliquefaciens* LL3) han mostrado este comportamiento ya que solo necesitan glucosa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, para la síntesis de  $\gamma$ -PGA (Cao *et al.*, 2011; Hsueh *et al.*, 2017, Sha *et al.*, 2019). La producción de 2,3-butanodiol y acetoína estuvo asociada con el crecimiento celular y el metabolismo de la glucosa, sin embargo, el 2,3-butanodiol se consumió cuando se agotó la glucosa en el medio. La concentración máxima de 2,3-butanodiol fue de 6.97 g/L (Figura 10E) y la acetoína fue de 9.51 g/L (Figura 10F). Bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este estudio, *B. velezensis* FZB42 no produjo  $\gamma$ -PGA, pero produjo más biomasa máxima ( $5.8 \times 10^9$  células/mL, 36 h), así como más surfactina (34-39 mg/L desde las 12 h de tiempo de cultivo) y más bacilomicina (8-40 mg/L desde las 12 h de tiempo de cultivo) que *B. velezensis* 83. Por otro lado, la cepa *B. velezensis* FZB42 mostró un comportamiento similar a *B. velezensis* 83 en la producción de 2,3-butanodiol y acetoína (Figura 10), así como en el consumo de glucosa, producción de acetato y lactato como metabolitos de sobreflujo de carbono (Anexo A, Anexo A, Figura A1-1).

En conclusión, las principales diferencias observadas entre estas dos cepas de *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42 fueron el crecimiento máximo,  $\gamma$ -PGA y la producción de lipopéptidos. Los genes (*pgdS*, *pgsEACB*) implicados en la síntesis de  $\gamma$ -PGA están presentes tanto en *B. velezensis* 83 como en *B. velezensis* FZB42 y son de alta identidad (98%). Estos resultados son evidencia de que estas dos cepas son fenotípicamente diferentes en cuanto a la producción de algunos metabolitos bajo las mismas condiciones de cultivo. *B. velezensis* 83 es una cepa productora de  $\gamma$ -PGA independiente del ácido glutámico (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2020), el cual es un compuesto precursor del polímero, en cambio actualmente, no existen reportes sobre la producción de  $\gamma$ -PGA por parte de *B. velezensis* FZB42 utilizando glucosa como fuente de carbono. Sha *et al.* (2019), sugieren que las cepas de *Bacillus* spp. que no producen  $\gamma$ -PGA tienen limitación de la síntesis de glutamato. A través de análisis transcriptómico, estos autores encontraron que la sobre expresión de los genes *citA*, *citB*, *icd* del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y que están relacionados con la síntesis de  $\alpha$ -cetoglutarato obtuvieron la producción de  $\gamma$ -PGA con la cepa *B. subtilis* NX-2 sin la adición de glutamato al medio de cultivo.

Por otra parte, las diferencias fenotípicas entre cepas de *Bacillus* pueden deberse a los patrones de metilación de los genes como resultado de la presencia de diferentes genes de restricción-modificación entre las cepas como lo han mostrado Reva *et al.* (2019) para *B. velezensis* UCMB5113, At1, UCMB5007 y UCMB5044. Las diferencias

encontradas respecto a la producción de surfactina y bacilomicina, probablemente estén asociadas a la señalización-regulación dependiente del sistema del QS (ComQXPA) y de las proteínas Rap-Phr de cada cepa (como se describió en la sección de análisis del genoma), ya que el gen *comX* y los genes *rapK1*, *rapK2* y *rapH* fueron únicos en la cepa *B. velezensis* 83. Así que es probable que las diferencias observadas entre *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42 en este estudio sobre la producción de surfactina, bacilomicina y  $\gamma$ -PGA, se deban a diferencias en la regulación y expresión génica de los grupos de genes *srf*, *bmy* y  $\gamma$ -PGA, como se ha demostrado para otros *Bacillus* spp.

Otra diferencia fenotípica muy notable (Balderas *et al.*, 2020), fue el patrón de colonización en las raíces de *A. thaliana* por *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42, el cual podría estar directamente relacionado con la producción de  $\gamma$ -PGA y de surfactina, como ha sido reportado para *B. amyloliquefaciens* C06 en la superficie de la manzana (Liu *et al.*, 2010). La capacidad de colonización de los agentes de control biológico en las superficies de las plantas es un factor determinante para la eficacia del control biológico.



**Figura 10.** Producción de metabolitos de *B. velezensis* 83 y FZB42 asociados a la actividad de control biológico y de promoción del crecimiento de las plantas. A) biomasa (cel/mL), B) surfactina (mg/mL), C) bacilomicina (mg/mL), D)  $\gamma$ -PGA (g/mL), E) 2,3-butanodiol (g/mL) y F) acetoína (g/L).

## 8.2. Eficacia de *B. velezensis* 83 en el control biológico de *C. gloeosporioides* en ensayos *in vivo* (cultivo de mango)

La eficacia de control biológico de *B. velezensis* 83 contra la antracnosis del mango causada por *C. gloeosporioides* fue evaluada con el ensayo *in vivo* llevado a cabo en un huerto productor de mango localizado en El Rosario, Sinaloa, México. Tres diferentes tratamientos biológicos con *B. velezensis* 83 y dos tratamientos químicos fueron aplicados en etapa pre-cosecha, y la eficacia para el control de antracnosis fue evaluada en frutos post-cosecha. Los resultados fueron comparados contra frutos control (provenientes de árboles sin tratamiento). Primeramente, cabe resaltar que ninguno de los tratamientos evaluados en este ensayo alcanzó el 100% de eficacia para el control de antracnosis (Tabla 13).

**Tabla 13.** Severidad y eficacia del control biológico de *B. velezensis* 83 en frutos de mango post-cosecha.

Tratamiento	Severidad (post-cosecha)	Eficacia (%)
Fungifree AB® (1 g/L)	4.8a	65.9
Fungifree AB® (2 g/L)	2.4a	82.9
Fungifree AB® (3 g/L)	2.8a	80.5
Captan 50 PH® (300 g/L)	2.1a	85.4
Cupravit Hidro® (400 g/L)	2.4a	82.9
Control (sin tratamiento)	14.2b	0

Letras diferentes significan diferencias significativas según ANOVA y Tukey  $\alpha=0.05$ .

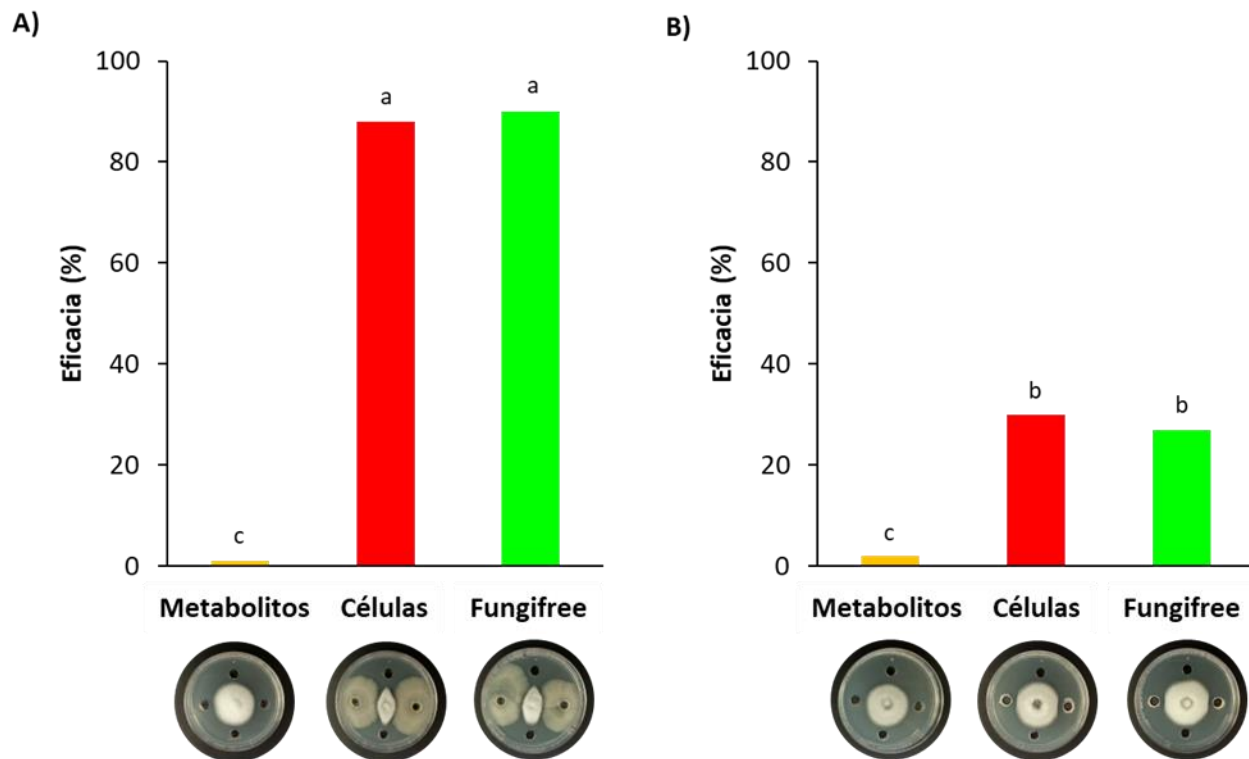
Sin embargo, la reducción de la severidad de antracnosis fue significativamente diferente en los frutos provenientes de árboles con tratamiento (ya sea biológico o químico), en contraste con los frutos provenientes de árboles control. Los resultados de las evaluaciones realizadas en los frutos indican que los tres tratamientos biológicos fueron estadísticamente igual de eficaces para reducir la severidad de antracnosis en los frutos que los dos tratamientos químicos convencionales utilizados en el huerto. Los tratamientos biológicos tuvieron entre 65-83% de eficacia de control de antracnosis en los frutos. Cabe mencionar que cuando se utilizan productos químicos para el control de la antracnosis, es importante asegurarse de que los límites máximos de residuos de plaguicidas estén por debajo de la concentración máxima permitida por la norma internacional. Por tanto, la relevancia de los resultados obtenidos con tratamientos de control biológico aplicando a *B. velezensis* 83 radica en que se trata de un producto inocuo para el consumo humano y que ejerce control de la antracnosis en mango Kent (entre 65 y 80%) de forma igualmente eficiente como los tratamientos con agroquímicos (Captan 50 PH® o Cupravit hydro®). Otros resultados de alta eficacia de control biológico de antracnosis han sido reportados utilizando a la bacteria

*Stenotrophomonas rhizophila* y a la levadura *Debaryomyces nepalensis* como tratamientos de control biológico en frutos de mango. Con *S. rhizophila*, se sugiere que el antagonismo de la bacteria inhibió la germinación y el crecimiento micelial del hongo debido a la competencia por espacio-nutrientes, producción enzimas líticas, VOC y sideróforos (Reyes-Pérez *et al.*, 2019). Por otra parte, en el caso de *D. nepalensis* se sugiere que el mecanismo de acción es la competencia por espacio-nutrientes con el fitopatógeno, adicionalmente se observó que la levadura retrasa la maduración y por lo tanto la senescencia del fruto, retardando así la aparición de antracnosis y disminuyendo la incidencia (número de frutos con antracnosis) de infección en contraste con frutos sin tratamiento sometidos a las mismas condiciones de almacenamiento post-cosecha (Luo *et al.*, 2015).

### **8.2.1. Estudio de los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 vs *C. gloeosporioides* en ensayos *in vitro* (medio PDA)**

Debido a las características del proceso de producción de Fungifree AB®, el formulado contiene dos factores de antagonismo que son: 1) esporas y 2) metabolitos (producidos durante el cultivo de la bacteria). A partir de esta sección, se utilizará el término “células” para describir la eficacia del formulado que contenía solo “esporas”, dado que el efecto de antagonismo se atribuye a la actividad de células vegetativas (resultado de las esporas que lograron germinar). Si bien está demostrado que el control biológico con Fungifree AB® es de alta eficacia para el control de antracnosis en mango, saber cuál es el factor de antagonismo que tiene el principal efecto de control biológico es determinante para establecer mejoras en el proceso de producción.

En la Figura 11 se muestran los resultados de inhibición del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides* con los formulados de cada factor de antagonismo (células o metabolitos) como tratamientos utilizando además a Fungifree-AB® (células+metabolitos) como control positivo. Estos ensayos son parte de un trabajo de tesis de Licenciatura (Venegas-Brito, 2015) bajo mi co-tutoría. En los ensayos *in vitro* con tratamientos preventivos (Figura 11A) de *B. velezensis* 83, la bacteria se estableció primero y aumentó su población, lo cual se hizo evidente con el incremento en el tamaño y forma de la colonia (competencia por espacio-nutrientes), además fue observado el típico halo de inhibición (antibiosis) que provocan las cepas de *Bacillus* spp. En contraste, en los ensayos con los tratamientos curativos (Figura 11B) al permitirle el establecimiento primeramente al hongo, los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial fueron significativamente menores (ANOVA, Tukey  $\alpha=0.05$ ). Con los tratamientos preventivos, los tratamientos que contienen células de la bacteria tuvieron un efecto de inhibición mayor al 80%, mientras que los tratamientos curativos solo causaron entre el 27 y 31% de inhibición, con respecto al control.

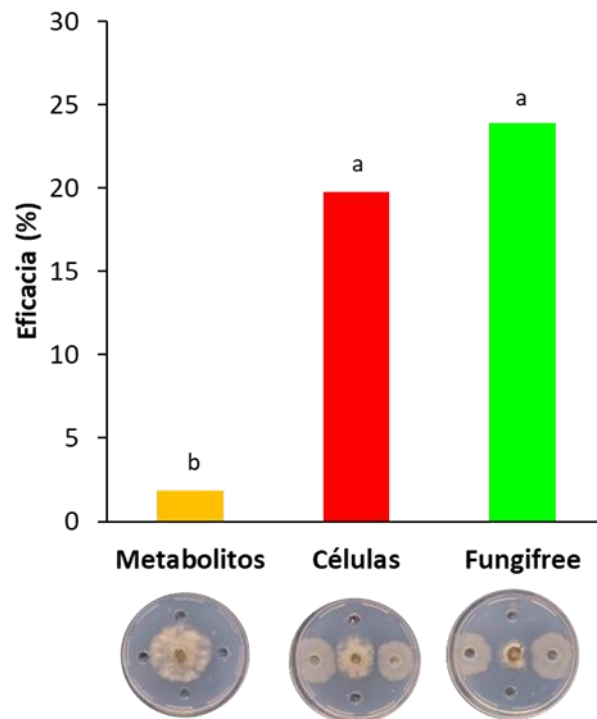


**Figura 11.** Eficacia (%) de inhibición del crecimiento *in vitro* (en medio PDA) de *C. gloeosporioides* confrontado a los diferentes factores de antagonismo de *B. velezensis* 83. En modo: a) preventivo y b) curativo. Letras diferentes significan diferencias significativas según ANOVA y Tukey  $\alpha=0.05$ .

En contraste el formulado de metabolitos solo causó menos del 2% de inhibición del crecimiento micelial tanto en tratamientos preventivos como curativos. Estos resultados de inhibición *in vitro* fueron comparados estadísticamente como un solo grupo, y se encontró que las diferencias fueron estadísticamente significativas (ANOVA, Tukey  $\alpha=0.05$ ) entre los tratamientos que contienen células y el que contiene solo a los metabolitos. Así, estos resultados demuestran que las esporas presentes en el formulado comercial fue el único factor responsable de la inhibición *in vitro* del crecimiento de *C. gloeosporioides* (cepa ATCC MYA 456). Luna-Bulbarela *et al.* (2018) reportaron que concentración mínima inhibitoria ( $MIC_{100}$ )  $>20 \mu M$  de bacilomicina D (1044 Da) afectó la germinación de esporas y el crecimiento micelial (en ensayos *in vitro*) de *C. gloeosporioides* (cepa 09). Por lo tanto, el poco efecto inhibitorio observado en la Figura 11, puede explicarse por la baja concentración de bacilomicina D contenida en el producto formulado (o algún otro compuesto antifúngico no cuantificado). A partir de los resultados del análisis por RP-HPLC del sobrenadante del cultivo de producción industrial utilizado para la preparación del formulado, se estimó que cada gramo de formulado “metabolitos” contenía  $3 \times 10^{-4}$  mg de bacilomicina D. Así que una suspensión de Fungifree AB® preparada con 2 g/L, contendría  $6 \times 10^{-4}$  mg de bacilomicina D/L ( $0.6 \mu M$ ), esta concentración está muy por debajo de la MIC reportada (Luna-Bulbarela *et al.*, 2018) para hongos como *C. gloeosporioides*.

### 8.2.2. Estudio de los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 vs *B. cinerea* en ensayos *in vitro* (en medio PDA, con hojas y con frutos de jitomate)

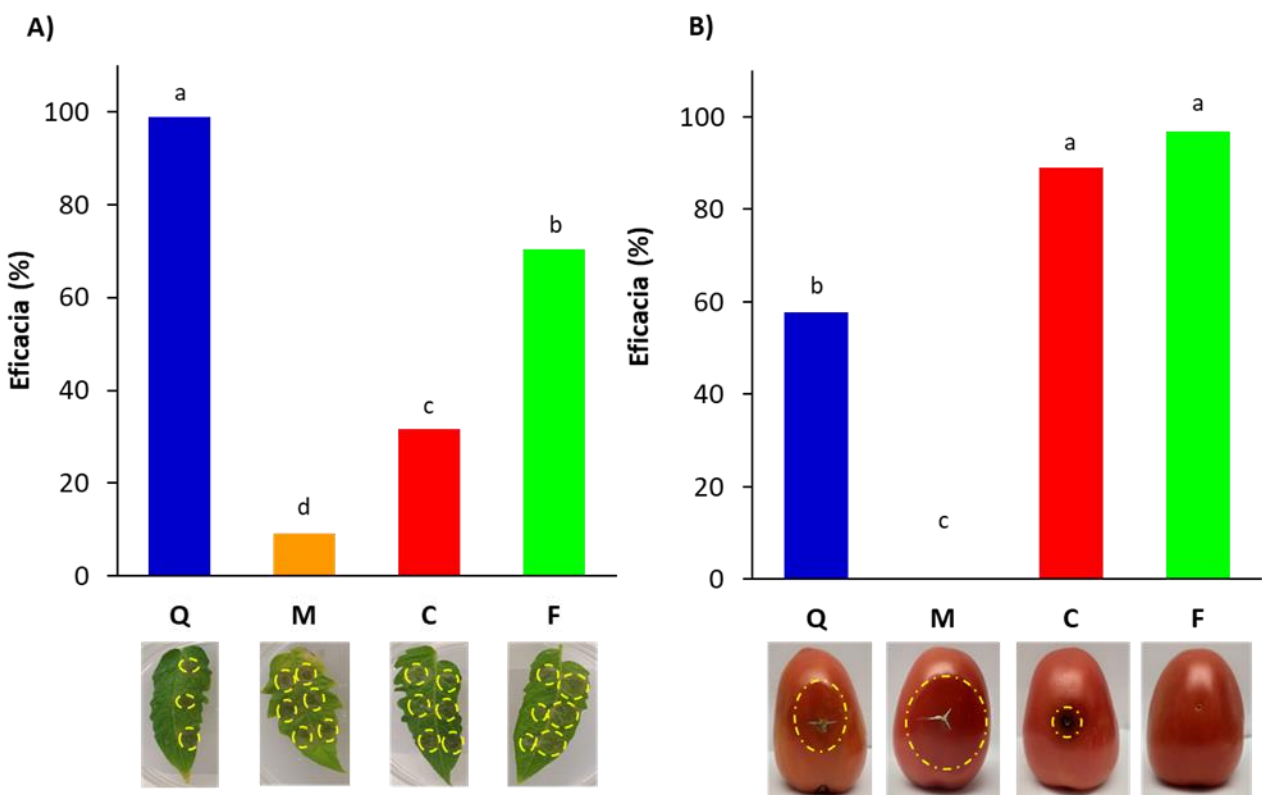
En la Figura 12 se muestran los resultados de inhibición del crecimiento *in vitro* (medio PDA) de *B. cinerea* con los formulados del factor de antagonismo como tratamientos utilizando además a Fungifree AB® como referencia. Estos ensayos son parte de un trabajo de tesis de Licenciatura (Gómez-Guerrero, 2021) desarrollada bajo mi tutoría. En los ensayos *in vitro* con tratamientos preventivos de *B. velezensis* 83 vs *B. cinerea* mostraron la misma tendencia que los resultados *in vitro* contra *C. gloeosporioides* (Figura 11). Los tratamientos que contenían células (formulado células y Fungifree AB®) de la bacteria tuvieron entre 19 y 24% de eficacia de control vs *B. cinerea* y fueron estadísticamente iguales. En contraste el formulado de metabolitos solo causó menos del 2% de inhibición del crecimiento micelial, y se observó la misma tendencia del resultado *in vitro* respecto a la no contribución significativa en el mecanismo de antibiosis con este factor de antagonismo.



**Figura 12.** Eficacia (%) de inhibición del crecimiento *in vitro* (en medio PDA) de *B. cinerea* confrontado a los diferentes factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 en modo preventivo. Letras diferentes significan diferencias significativas según ANOVA y Tukey,  $\alpha=0.05$ .

En la Figura 13A se muestran los resultados de los ensayos de control biológico realizados con los formulados de los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea* ( $10^4$  esporas/punto de infección) en hojas, la eficacia de control biológico fue comparada contra un testigo químico (Clorotolonil). Los tratamientos fueron estadísticamente diferentes entre ellos. En tratamiento preventivo, el tratamiento con mayor eficacia de control

de *B. cinerea* fue el químico (>95%). La eficacia de inhibición con Fungifree AB® (>70%) fue mayor que utilizar el formulado que contenía solamente células (~32%), y en ambos casos fue mayor que utilizar un formulado con solamente metabolitos (<10%). Estos resultados permiten concluir que en Fungifree AB® el factor de antagonismo que ejerció mayor efecto contra *B. cinerea* en hojas de jitomate fueron las células. Sin embargo, la eficacia de inhibición de Fungifree AB® es el resultado de la interacción entre células y metabolitos. Dado que hubo diferencias significativas de la eficacia entre el formulado que sólo contenía células y el formulado Fungifree AB®, es probable que en Fungifree AB® otros metabolitos (p. ej. surfactina, VOC, enzimas, sideróforos, nutrientes residuales, moléculas de QS, por citar algunos, o la interacción entre ellos) excretados durante el cultivo de la bacteria estuvieron presentes y contribuyeron en el control biológico. Por ejemplo, otras actividades biológicas de la surfactina son favorecer la formación de la biopelícula de *Bacillus*, motilidad, colonización-permanencia y esporulación de *Bacillus* en la superficie de los tejidos de las plantas (Zerrouh *et al.*, 2014; Rahman *et al.*, 2021; Stoll *et al.*, 2021) -o en algunos casos- activar la resistencia sistémica en la planta (Stoll *et al.*, 2021)



**Figura 13.** Efecto del tratamiento de control biológico de *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea* aplicado de modo preventivo: A) hojas y B) frutos de jitomate. Q: químico, M: metabolitos, C: células, F: Fungifree AB®. En estos ensayos, el formulado metabolitos contiene <math>10^3</math> UFC residuales de *B. velezensis* 83. Letras diferentes significan diferencias significativas según ANOVA y Tukey  $\alpha=0.05$ .

Kong *et al.* (2010) reportaron el efecto antifúngico de la surfactina que produjo la cepa *B. licheniformis* N1, la aplicación foliar de surfactina (250-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) controló en más del 80% de la severidad de la infección causada por *B. cinerea* en plantas de tomate crecidas en invernadero, sin embargo, la alta concentración de surfactina se obtuvo cultivando a la bacteria en medios ricos no definidos y la producción del lipopéptido puede ser variable y



costosa. Stoll *et al.* (2021), reportaron que la cepa *B. velezensis* BBC047 redujó la severidad de la infección causada por *B. cinerea* de la misma forma que aplicar 25 µg/mL surfactina (grado estándar) como tratamientos aplicados en hojas o en raíz de jitomate, estos autores sugieren que el papel principal de la surfactina es favorecer la colonización de la bacteria en hoja o en raíz, para que otros mecanismos de antagonismo posteriormente actúen contra *B. cinerea*. Por otra parte, Zeriuoh *et al.* (2014) reportaron que una cepa mutante de *B. subtilis* UMAF6614 no productora de surfactina, logró menor control de infecciones causadas por *X. campestris*, *P. carotovorum* y *P. fusca* en hojas de melón, lo cual fue asociado con deficiencias en la formación de biopelícula y baja colonización-permanencia en hojas debido a la no producción de proteína TasA y exopolisacárido (dos componentes muy importantes en la estructura de la biopelícula). Se observó (Zeriuoh *et al.*, 2014), que la adición de 20 µM de surfactina estándar (Sigma) en el medio crecimiento de la bacteria, restableció la producción de TasA y el exopolisacárido, resultando en la formación de biopelícula y a colonización-permanencia sobre hojas de melón igual a la de la cepa silvestre.

Chen *et al.* (2019), reportaron que el uso de células vegetativas de *B. amyloliquefaciens* RS-25 tuvieron mayor eficacia que el sobrenadante filtrado (por membranas de 0.22 µm) o los extractos metanólicos (conteniendo lipopéptidos) del sobrenadante del cultivo de esa cepa, para el control de *B. cinerea* en frutos post-cosecha. La colonización, la producción de lipopéptidos (surfactina, bacilomicina D y fengicina), enzimas como celulasa y proteasa, sideróforos, así como VOC fueron asociados a la eficacia de control de *B. amyloliquefaciens* RS-25 en tomate, fresa y uva. Gao *et al.* (2017), reportaron que *B. velezensis* ZSY-1 produjo VOC (Pirazina (2,5-dimetil), benzotiazol, 4-cloro-3-metil, y fenol-2,4-bis (1,1-dimetiletil)) que tuvieron entre 91-100% de inhibición de *B. cinerea* en ensayos *in vitro*. Toral *et al.* (2018), reportaron que *B. velezensis* XT1 CECT 8661 redujo en 50, 12 y 100% la infección causada por *B. cinerea* en tomate, fresa y uva, respectivamente, con respecto a frutos no tratados. El control de la infección estuvo asociada a la presencia de lipopéptidos (surfactina, bacilomicina D, fengicina A y B) en el sobrenadante del cultivo de *B. velezensis* XT1 CECT 8661. La cepa *B. amyloliquefaciens* QST713 (Serenade) es un antecedente de mayor eficacia de control biológico que un fungicida químico al ser utilizado en ensayos de laboratorio (plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Magirus con inoculaciones artificiales de *B. cinerea*) y en pruebas de invernadero (Samaras *et al.*, 2021). *B. cinerea* es un hongo que es controlado con fungicidas químicos como anilino pirimidinas, hidroxianilidos, fenilpirroles, dicarboxamidas, benzimidazoles y compuestos botrycidas que son inhibidores de la enzima succinato deshidrogenasa, sin embargo, algunas cepas pueden presentar resistencia a estos compuestos, por lo tanto, hacen complicado el control de la infección en plantas. Se ha observado que la aplicación de tratamiento biológico utilizando un producto formulado con la cepa *B. amyloliquefaciens* QST713 alternado con un tratamiento químico, redujo la presencia de cepas de *B. cinerea* resistentes a fungicidas químicos, este es un ejemplo de una estrategia para el control integrado de la infección causada por *B. cinerea* (Samaras *et al.*, 2021).

En contraste con la rizósfera (ambiente rico en nutrientes), la filósfera es un ambiente limitado en nutrientes y en el cual factores como la disponibilidad de agua y la luz UV (entre otros), pueden afectar el establecimiento de los microorganismos (Vorholt, 2012). El género *Bacillus* puede utilizar varios compuestos como fuentes de carbono para su crecimiento (Borriss *et al.*, 2020), siendo la glucosa la fuente de carbono preferida que estas bacterias utilizan debido a la represión catabólica de carbono (CCR) que impide que las células utilicen otros compuestos como fuente de carbono en presencia de glucosa (Chen *et al.*, 2020). Chen *et al.* (2020), reportaron que una cepa mutante de *B. amyloliquefaciens* WH1 no productora de surfactina ( $\Delta$ srfA), además de presentar deficiencias en

formación de biopelícula y esporulación, presentó muerte celular aún con disponibilidad fuentes de carbono (diferentes a la glucosa) en el medio de cultivo, en contraste con la cepa silvestre. La adición de surfactina (80 µg/mL) al medio de cultivo de la cepa mutante ( $\Delta srfA$ ), incrementó la actividad de enzimas como la  $\alpha$ -amilasa y glucosidasa, las cuales le permiten metabolizar otros compuestos como fuente de carbono. Si bien la suplementación de glucosa al medio de cultivo mantuvo el crecimiento de la cepa mutante ( $\Delta srfA$ ), no reestableció la esporulación del cultivo como la cepa silvestre (WH1) debido a la falta de surfactina. Durante su cultivo, *B. velezensis* 83 produce acetoína, 2,3-butanodiol y  $\gamma$ -PGA como metabolitos de sobreflujo de carbono, estos compuestos pueden estar incluidos en el formulado Fungifree AB<sup>®</sup> y ser utilizados por la bacteria una vez agotada la glucosa (Cristiano-Fajardo *et al.*, 2020).

Entonces, los antecedentes presentados por Chen *et al.* (2020), y los resultados obtenidos en este trabajo de investigación utilizando Fungifree AB<sup>®</sup> y el formulado células, permiten sugerir que la diferencia significativa en la eficacia de control observada en hojas, pudo deberse (más no exclusivamente) al contenido de surfactina en los formulados: Fungifree AB<sup>®</sup> (2 g/L: con 60 µM de surfactina) y células (sin surfactina). La surfactina pudo contribuir en: 1) la liberación de la represión catabólica de las células para utilizar otras fuentes de carbono disponibles en la superficie de la hoja, a este respecto, cabe mencionar que (el soporte de la formulación de Fungifree AB<sup>®</sup> puede ser una fuente alternativa a la glucosa, así como acetoína, el 2,3-butanodiol y el  $\gamma$ -PGA, 2) favorecer la formación de la biopelícula o 3) mantener el crecimiento de las células vegetativas de la bacteria que efectuaron la síntesis *de novo* de metabolitos antimicrobianos (p. ej. bacilomicina D) contra *B. cinerea*.

En la Figura 13B se muestran los resultados de los ensayos de control biológico realizados con los formulados de los factores de antagonismo de *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea* ( $10^4$  esporas/punto de infección) en frutos de jitomate. Estos ensayos fueron realizados con las mismas condiciones experimentales que los ensayos con hojas. En modo preventivo, el tratamiento Fungifree AB<sup>®</sup> y el de células tuvieron la mayor eficacia de control (entre 89-97%) y fueron estadísticamente iguales entre ellos, seguido del testigo químico (58%), los metabolitos no tuvieron eficacia de control. Cabe resaltar que se observó la misma tendencia que en los ensayos con medio PDA: no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con Fungifree AB<sup>®</sup> y células. En conclusión, en Fungifree AB<sup>®</sup> el factor de antagonismo que ejerció mayor efecto contra *B. cinerea* en frutos de jitomate fueron las células. En este modelo de control biológico se observaron resultados diferentes de eficacia de control de los tratamientos entre hojas y frutos. En los frutos la eficacia de los tratamientos biológicos con formulados que contenían células fue mayor que en hojas. En contraste el tratamiento químico tuvo mejor control de la infección en hojas que en frutos. Tanto en frutos como en hojas el tratamiento con el formulado que contenía sólo metabolitos tuvo la menor eficacia de control.

Galitskaya *et al.* (2022) reportaron que la fracción de precipitados ácidos (en los cuales se detectó surfactina y fengicina) recuperados del cultivo de *Bacillus mojavensis* P1709 disminuyeron la incidencia de infección (porcentaje de heridas infectadas por fruto) causada por *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en frutos de jitomate Cherry post-cosecha. Los frutos tratados con los precipitados ácidos diluidos tuvieron 7% de incidencia de infección al segundo día post-infección con el fitopatógeno, sin embargo, la protección se perdió transcurridos siete días post-infección presentándose casi el 80% de incidencia de infección por *F. oxysporum* (Galitskaya *et al.*, 2022), lo cual indica que la sola presencia de los lipopéptidos no fue suficiente para el control de la infección causada por el hongo.

Contrastando los resultados obtenidos de la eficacia de control en los frutos con la obtenida en hojas, se sugiere que la disponibilidad de nutrientes favoreció la actividad de *B. velezensis* 83 contra *B. cinerea* y que por esta razón la eficacia de control observada en frutos fue mayor que la observada en hojas. Es probable que la competencia por espacio-nutrientes (colonización) de *B. velezensis* 83 y la subsecuente síntesis *de novo* de metabolitos antifúngicos en el fruto, hayan sido los principales mecanismos de antagonismo para controlar la infección de *B. cinerea*.

Los resultados de los ensayos en hojas y en frutos presentados en este trabajo, permiten resaltar la relevancia del control biológico con *B. velezensis* 83 como alternativa ante infecciones causadas por especies de hongos fitopatógenos como el caso de *B. cinerea*, que afecta no solo al jitomate, sino a muchos otros cultivos en etapa pre-cosecha, además de la oportunidad de aplicar tratamientos biológicos en la etapa post-cosecha. Estos resultados fueron integrados en el artículo reportado por Balderas-Ruíz *et al.* (2021).

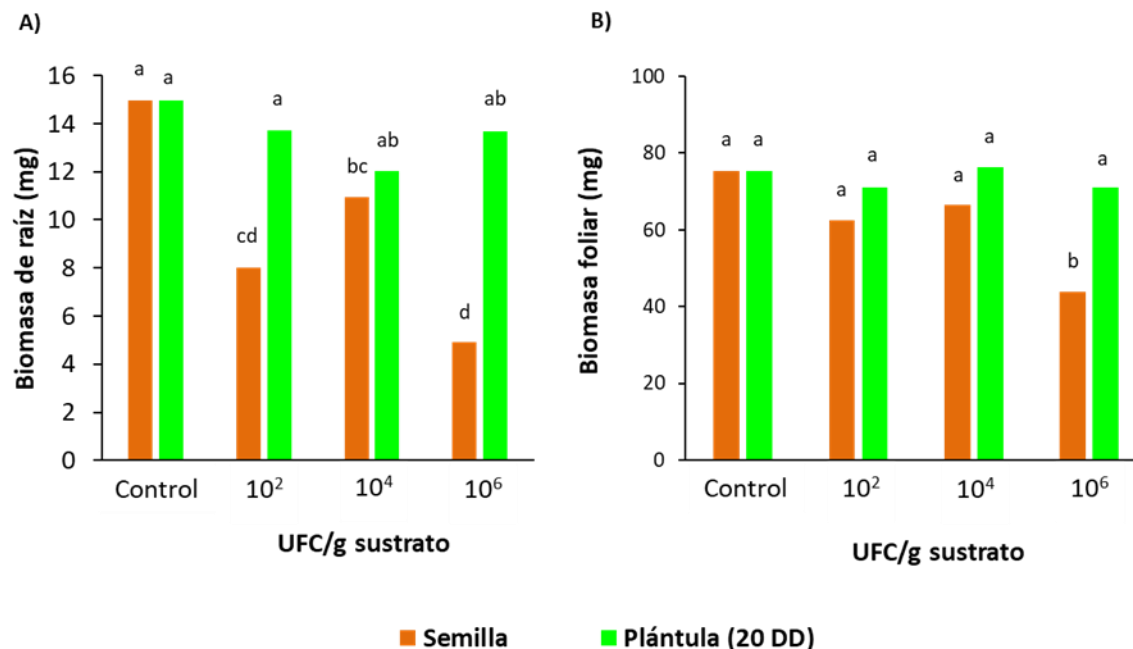
Los resultados generados en este trabajo de investigación y los reportados por Martínez-Terrazas (2022) sugieren que la eficacia de *B. velezensis* 83 como ACB aplicado en campo, puede ser el resultado de la interacción de diferentes mecanismos de antagonismo (competencia por espacio-nutrientes, antibiosis e ISR) contra los fitopatógenos. Martínez-Terrazas (2022), reportó que la inoculación de *B. velezensis* 83 ( $1 \times 10^5$  cel/mL) en raíz de plántulas de *A. thaliana* crecidas en cultivos *in vitro*, disminuyó la incidencia de la infección causada por *B. cinerea* en hojas de *A. thaliana*, cuando la bacteria fue inoculada en raíz a las 24 h previas a la inoculación de *B. cinerea* en las hojas. Con ensayos de interacción *in vitro* de plántulas de *A. thaliana* inoculadas en raíz sólo con *B. velezensis* 83, se encontró que *B. velezensis* 83 produjo acetoina entre las 24-48 h post-inoculación, y que en los sistemas de interacción (*A. thaliana*-*B. velezensis* 83) en los cuales las plántulas fueron posteriormente infectadas en las hojas con *B. cinerea*, *B. velezensis* 83 incrementó la producción de acetoina y la prolongó hasta las 72 h de cultivo. La acumulación de transcritos de genes marcadores de las vías de señalización por SA, JA y Et (genes PDF1.2, AOS, PR4, ACS6), sugieren que hubo una estimulación de resistencia sistémica en *A. thaliana* por parte de *B. velezensis* 83.

### **8.2.3. Efecto promotor de crecimiento que ejerce *B. velezensis* 83 al aplicarla en diferentes concentraciones y en diferentes estados fenológicos del cultivo de jitomate (semilla, plántula y crecimiento vegetativo de la planta cultivada en invernadero)**

Se sabe que dentro del género *Bacillus* varias cepas tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas y la productividad de los cultivos (Kumar *et al.*, 2011). Varios autores han mostrado evidencias de que *Bacillus* spp. afecta la arquitectura y desarrollo de la raíz de *A. thaliana* dependiendo de factores como el tipo de medio de cultivo en el cual se desarrolla la interacción bacteria-planta (Asari *et al.*, 2016; Gallegos-Monterrosa *et al.*, 2016), la densidad de población de la bacteria y de su distancia con respecto a la raíz de la planta (Ryu *et al.*, 2005; Asari *et al.*, 2017), de la interacción específica planta-PGPR (Vaikuntapu *et al.*, 2014), del tipo de compuesto que produce la PGPR y cómo éste afecta la respuesta a hormonas (p. ej. Aux, CK y Et) (López-Bucio *et al.*, 2007) y a las vías de señalización que están directamente relacionadas con el desarrollo de la raíz (Verbon y Liberman, 2016).

Dados estos antecedentes, primero se realizó un ensayo para evaluar el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de UFC de *B. velezensis* 83/g sustrato sobre el crecimiento de plántulas de jitomate. Las concentraciones evaluadas fueron  $10^6$ ,  $10^4$  o  $10^2$  UFC de *B. velezensis* 83/g sustrato al jitomate en dos modalidades de tratamientos: 1) desde la germinación de la semilla o 2) en plántulas con 20 DD. En la Figura 14 se muestran los resultados del efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de las plántulas en charolas de germinación, el efecto del tratamiento fue evaluado en términos de la biomasa (peso seco) de la parte foliar y de la raíz a los 30 DD. Se observó que cuando los tratamientos fueron aplicados desde la germinación de la semilla hubo un efecto negativo en el incremento de biomasa de raíz con diferencias significativas respecto a las plantas control (sin bacteria), y el mayor efecto negativo se observó sobre la biomasa de raíz y foliar cuando se aplicó la bacteria en alta concentración celular ( $10^6$  UFC/g sustrato). En contraste, los mismos tratamientos aplicados a plántulas con 20 DD, no tuvieron efecto sobre incremento de biomasa de raíz y biomasa foliar de las plántulas con respecto a las plántulas control (sin bacteria). Utilizando un método basado en qPCR desarrollado específicamente para la detección de DNA de *B. velezensis* 83 (Balderas *et al.*, 2015) se encontró que *B. velezensis* 83 se estableció en el rango de  $5 \times 10^4$ - $2 \times 10^5$  UFC/g raíz cuando estuvo presente desde la etapa de germinación de la semilla. Mientras que cuando *B. velezensis* 83 fue aplicada en plántulas de 20 DD, la bacteria fue detectada a razón de  $3 \times 10^4$  UFC/raíz solo en las plántulas del tratamiento con  $10^6$  UFC/g sustrato. Los resultados indicaron que la bacteria se estableció mejor en la raíz de la plántula de jitomate cuando estuvo presente desde el inicio de la germinación de la semilla, sin embargo, la alta concentración de bacteria presente en el sustrato, provocó que el desarrollo de la parte foliar y de la raíz de las plántulas de jitomate fuera negativamente afectado. Así que con estas condiciones experimentales no hubo evidencia de que *B. velezensis* 83 sea una PGPR para el jitomate variedad Frodo con tratamientos aplicados desde la etapa de germinación de la semilla o a plántula. Estos resultados fueron integrados en el artículo reportado por Balderas-Ruiz *et al.* (2021).

Se sabe que la germinación de una semilla y el crecimiento de la planta es afectada por varios factores, pero principalmente por las hormonas vegetales como el ABA, el ET, las Gb, las Aux (p. ej. IAA), las Ck y los brasinoesteroides (Miransari y Smith, 2014). Se ha sugerido que el efecto promotor del crecimiento vegetal de *B. velezensis* FZB42 sobre *Lemna minor* estuvo asociado con la producción de compuestos de auxina por parte de la bacteria; sin embargo, solo los filtrados diluidos del cultivo bacteriano o la inoculación de baja concentración de células de *B. velezensis* FZB42 ( $1 \times 10^5$  UFC) mostraron un efecto de promoción del crecimiento de plántulas de *L. minor* cultivadas *in vitro*. La inoculación de alta concentración de *B. velezensis* FZB42 ( $1 \times 10^7$  UFC) tuvo un efecto negativo en el crecimiento de las plántulas (Idris *et al.*, 2007). Este efecto es similar a lo observado con la inoculación de *B. velezensis* 83 en alta concentración desde la siembra de semilla de jitomate.



**Figura 14.** Efecto de la aplicación de *B. velezensis* 83 al sustrato de plántulas jitomate variedad Frodo. A) Biomasa de raíz (mg) y B) Biomasa foliar (mg). Control: plántulas sin inoculación de bacteria. Letras diferentes significan diferencias significativas según ANOVA y Tukey  $\alpha=0.05$ .

La producción de auxinas por parte de microorganismos benéficos promueve la interacción con la planta, así como la resistencia sistémica dependiente del JA que puede presentar la planta, la cual a su vez afecta la expresión de genes involucrados en la síntesis y transporte de auxinas (entrada y salida de auxina) (Tsukanova *et al.*, 2017). Además, se ha reportado (Pérez-Flores *et al.*, 2017) que la acetoina emitida por *Bacillus methylotrophicus* M4-96 afectó la expresión de genes de auxinas y promovieron el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales en *A. thaliana*. Se ha observado (Asari *et al.*, 2016) que en un medio que contenía exudados de la raíz de *A. thaliana*, los VOC producidos por *B. amyloliquefaciens* UCMB5113 aumentaron 3 veces la biomasa vegetal, independientemente del número de bacterias inoculadas. Sin la adición del exudado, la biomasa de la planta aumentó dos veces, pero la alta concentración de bacteria afectó negativamente a la biomasa de la planta. Además, la interacción de la señalización de las auxinas con otras hormonas vegetales (como con Ck y Et) es compleja y afecta a varios procesos fisiológicos de la planta al mismo tiempo (Liu *et al.*, 2017). La promoción del crecimiento vegetal no solo depende de la producción de auxinas, sino que también podrían estar involucrados otros factores en la bioestimulación del crecimiento vegetal provocada por una PGPB. Además de la síntesis de IAA y la solubilización de fosfatos, la producción de HCN, sideróforos y NH<sub>3</sub>, la actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos y la mitigación del estrés abiótico, fueron las características asociadas al mayor porcentaje de germinación de semillas y crecimiento de plántulas promovido por cepas de *Bacillus* inoculadas en tomate (Ramavath *et al.*, 2019). La formación de biopelículas (que implica la síntesis de TasA y la producción de EPS por cepas de *Bacillus*) se ha encontrado como un factor importante de *B. amyloliquefaciens* 54 en la colonización de raíces y para inducir tolerancia a la sequía en plantas de tomate (Wang *et al.*, 2020). Se ha demostrado que la producción de EPS es determinante para la capacidad de *B. velezensis* FZB42 para la formación de biopelículas y, por lo tanto, para la colonización de raíces de tomate (Al-Ali *et al.*, 2018). Sin embargo, también se ha observado

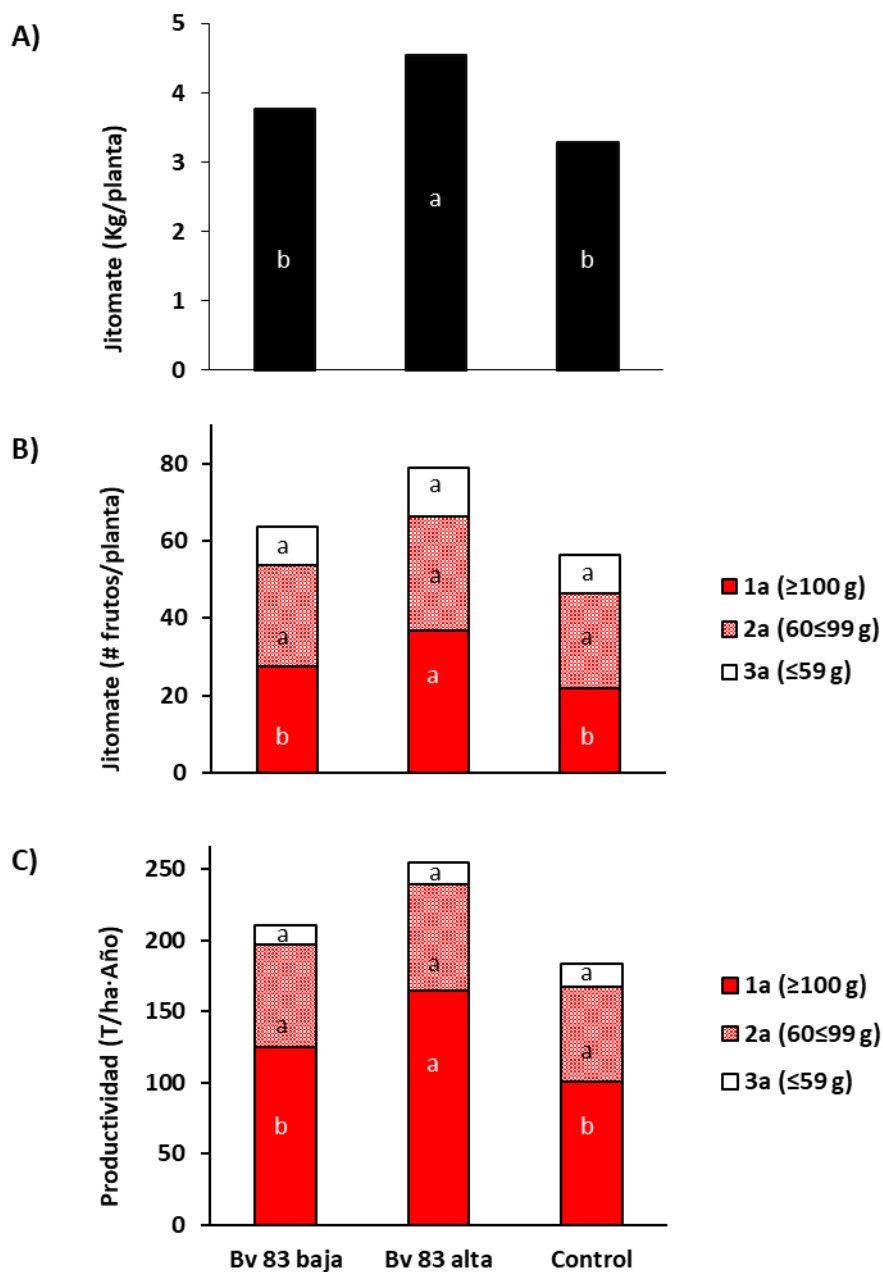
que el crecimiento exacerbado de la biopelícula de *B. velezensis* FZB42 afecta negativamente el crecimiento *in vitro* de las plántulas de *A. thaliana* (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Por otro lado, las cepas podrían tener diferentes capacidades para promover el crecimiento de las plantas y, en ocasiones, también se puede observar una disminución en algunos parámetros de crecimiento de las plántulas como por ejemplo la longitud del tallo y el peso seco de la raíz (Hernández-Pacheco *et al.*, 2021).

El efecto promotor del crecimiento vegetal de *B. velezensis* 83 se ha observado en *A. thaliana* como aumento de la biomasa de raíz y foliar, y en maíz como aumento de la altura de la planta y de la biomasa de raíz (Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Sin embargo, en el presente trabajo no se observó que la inoculación de *B. velezensis* 83 incrementara la biomasa radicular o del follaje de la plántula de jitomate (variedad Frodo) con los diferentes tratamientos (concentración) aplicados al sustrato en la etapa de germinación de la semilla o al sustrato de la plántula. En contraste, la alta concentración de bacterias inoculadas en el sustrato causó un efecto negativo en el desarrollo de la parte aérea y de la raíz de las plántulas de jitomate como se ha observado en otros modelos de interacción planta-PGPB (Idris *et al.*, 2007; Vaikuntapu *et al.*, 2014; Balderas-Ruíz *et al.*, 2020). Es probable que el establecimiento de *B. velezensis* 83 en las raíces de las plántulas cuando la bacteria estuvo presente desde el inicio de la germinación de las semillas estuvo asociado a la concentración diferencial de ácidos orgánicos (como el ácido málico) en la raíz de tomate. Los exudados de tomate están compuestos principalmente por azúcares y ácidos orgánicos, siendo estos últimos los de mayor concentración en los exudados, ambos tipos de compuestos aumentan a medida que crece la planta. Los principales ácidos orgánicos están representados por los ácidos cítrico, succínico y málico, mientras que la fructosa y la glucosa son los principales azúcares (Kamilova *et al.*, 2006). Se ha reportado (Tan *et al.*, 2013) que la propiedad quimioatrayente de los exudados de jitomate se correlacionó positivamente con las concentraciones de los compuestos en los exudados, siendo el ácido málico uno de los principales compuestos que promovieron la quimiotaxis, el movimiento tipo *swarming* y el establecimiento de *B. amyloliquefaciens* T-5 en raíz de plantas de jitomate. Por otro lado, se ha observado (Tan *et al.*, 2013) un aumento de hasta un orden de magnitud en el nivel de población (UFC/g raíz) de *B. amyloliquefaciens* T-5 en raíces de jitomate entre 7 y 14 días después de la inoculación de PGPR, esto es, cuando el ácido málico estaba presente en la rizósfera de las plantas de tomate. Por lo tanto, considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se plantea la siguiente hipótesis: para la inoculación en la etapa de germinación de la semilla 1) *B. velezensis* 83 produjo un compuesto promotor del crecimiento vegetal (hormona vegetal o VOC) que afectó la etapa de germinación de la semilla y luego todo el crecimiento de la planta o 2) *B. velezensis* 83 inoculada en alta concentración estableció rápidamente la biopelícula y afectó el desarrollo de la raíz de la planta y, por lo tanto, la absorción de nutrientes.

Por otra parte, se evaluó el efecto de la aplicación de tratamientos de *B. velezensis* 83 (en baja o alta concentración de UFC) a plantas cultivadas en invernadero, sobre la producción de jitomate. En la Figura 15 se observa que no hubo diferencias significativas de la producción de jitomate cuando las plantas fueron inoculadas con una concentración baja (correspondiente a  $1 \times 10^6$  UFC de *B. velezensis* 83/planta ó 0.001 g Fungifree AB®/L) con respecto a las plantas control. En contraste con el tratamiento sustrato concentración alta (correspondiente a  $1 \times 10^8$  UFC de *B. velezensis* 83/planta 0.1 g Fungifree AB®/L) las plantas produjeron 4.5 kg/planta (11.3 kg/m<sup>2</sup>) (Figura 15A) y las diferencias fueron significativas con respecto al control. Con el tratamiento de *B. velezensis* 83 en concentración alta las plantas produjeron en promedio 78 frutos/planta, mientras que con el tratamiento *B. velezensis* 83 en concentración baja fue de 62 frutos/planta.

Un resultado muy interesante es que las plantas inoculadas con una concentración alta, además de producir una mayor cantidad de frutos/planta, también generaron una mayor cantidad de frutos de primera calidad (Figura 15B). Con el tratamiento *B. velezensis* 83 en concentración alta las plantas produjeron en promedio 37 frutos/planta de primera calidad, en contraste con el tratamiento *B. velezensis* 83 en concentración baja y el control las plantas produjeron menos de 27 frutos/planta. En la producción de frutos de segunda y tercera calidad no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con *B. velezensis* 83 y el control. La proyección estimada del rendimiento de producción de jitomate con el tratamiento *B. velezensis* 83 en concentración alta fue de 254 T/Ha·año (Figura 15C) y las diferencias fueron significativas con respecto a la producción de las plantas control para las cuales se estimó producción de menos de 211 T/Ha·año. Con el tratamiento sustrato concentración alta se estimó que las plantas tienen la capacidad de producir 164 T/ha·año de jitomate de primera calidad ( $\geq 100$  g/fruto), lo cual equivale al 63% de la producción anual, mientras que los otros tratamientos tuvieron la capacidad de producir menos de 125 T/Ha·año de primera calidad, lo cual fue equivalente a menos del 59% de la producción anual. También se estimó que con ese tratamiento el rendimiento incrementó ~41% con respecto al rendimiento promedio reportado (180 T/Ha·año) en México entre el año 2017-2021 (SIAP 2021, <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>). Estos resultados fueron integrados en el artículo reportado por Balderas-Ruíz *et al.* (2021).

Akram *et al.* (2015) sugieren que el efecto promotor del crecimiento de *Bacillus fortis* y *B. subtilis* sobre plantas de jitomate y de la productividad de jitomate, estuvo asociado a la producción de IAA, sideróforo y solubilización de fosfato, que dio como resultado mayor biomasa de raíz y de la parte foliar de la planta. Pishchik *et al.* (2018) reportaron que la inoculación de *B. subtilis* en plantas de jitomate incrementó 24 y 21% la productividad de jitomate variedad Licurich y Moldova, respectivamente, con respecto a plantas control (sin inoculación de bacteria). Los incrementos estuvieron asociados al incremento en el contenido de clorofila en la planta, así como a una mayor altura y biomasa de la planta, que dio como resultado mayor producción de frutos/planta y frutos de mayor peso. He *et al.* (2019) reportaron que el efecto de la inoculación individual de *Bacillus pumilus*, *P. putida*, *B. amyloliquefaciens* o *B. mojavensis* incrementó la producción de frutos en plantas de jitomate, en 39%, 24%, 21% y 18%, respectivamente, comparado con plantas control (sin inoculación de bacteria). La inoculación con estas bacterias incrementó la biomasa, así como el contenido de agua en la raíz (lo cual favorece la movilidad de nutrientes), que dio como resultado mayor contenido de macro y micronutrientes en frutos de jitomate. En el genoma de *B. velezensis* 83 están presentes los genes para la producción de IAA, sideróforo y fitasa (solubilización de fosfato), así que es probable que estos metabolitos participen en el efecto de promoción de crecimiento de las plantas.



**Figura 15.** Efecto de los tratamientos de *B. velezensis* 83 en la productividad del cultivo de jitomate en invernadero. A) producción de jitomate (kg/planta) en función del tratamiento. Bv 83 baja: concentración de  $1 \times 10^6$  UFC de *B. velezensis* 83/planta, Bv 83 alta: concentración de  $1 \times 10^8$  UFC de *B. velezensis* 83/planta, y control: plantas sin aplicación de bacteria. B) Número de frutos/planta producidos por categoría de calidad en función del tratamiento. C) Calidad de los frutos en función del tratamiento. Calidad de frutos: 1<sup>a</sup>  $\geq 100$  g, 2<sup>a</sup>  $60 \leq 99$  g y 3<sup>a</sup>  $\leq 59$  g. Letras diferentes significan diferencias significativas según la prueba de Welch ( $\alpha=0.05$ ) asumiendo muestras sin varianzas iguales, seguida por la prueba Post-Hoc con el método de Games-Howell ( $\alpha=0.05$ ).



El jitomate es la principal hortaliza cultivada en agricultura protegida (malla sombra e invernadero) en México (FIRA, 2017). Se sabe que los rendimientos de la producción siempre varían en función de las tecnologías empleadas, desde el cultivo a campo abierto, hasta la producción en invernaderos altamente tecnificados con sistemas automatizados de riego, nutrición y control fitosanitario. Por ejemplo, desde el 2009 en México se considera que los rendimientos de la producción de tomate en invernaderos de baja tecnología es de aproximadamente 120 T/ha, en tecnología media de 200 a 250 T/ha, y en la alta tecnología hasta de 600 T/ha. En este trabajo, *B. velezensis* 83 fue aplicada al sustrato para el cultivo de jitomate con el objetivo de evaluar el efecto de promotor del crecimiento de plantas. En resumen, se observó que cuando la bacteria fue aplicada al sustrato desde la germinación de la semilla, el crecimiento de las plántulas fue afectado negativamente y cuando la bacteria fue aplicada a plántulas (20 DD), su crecimiento fue igual que el de plántulas no tratadas. En cambio, en plantas cultivadas en invernadero, se observó un evidente efecto estimulante de la producción de frutos con el tratamiento *B. velezensis* 83 aplicada al sustrato en concentración alta, con el potencial de estimular la producción de jitomate dentro del rango esperado para un invernadero de tecnología media.

Finalmente, se realizó un análisis de rentabilidad de los tratamientos con *B. velezensis* 83 en cultivo de jitomate en invernadero (Anexo B), esta información se presentó en la publicación de Serrano-Carreón *et al.* (2022) en la cual soy coautora. El costo unitario de producción (CUP) del jitomate cultivado en invernadero fue calculado considerando el rendimiento promedio de tomate (T/ha·año) estimado para cada tratamiento y el control. El costo de producción involucra los costos variables y fijos. Los costos variables estuvieron constituidos por el costo de los insumos (semilla, agroquímicos, fertilización) y el costo de la mano de obra directa. Los gastos fijos están representados por el costo de accesorios y herramientas necesarios para llevar a cabo las actividades culturales, servicios (renta de invernadero, amortización de inversión fija inicial) y asistencia técnica para el manejo del cultivo de jitomate. La amortización se calculó considerando un interés de financiamiento del 12%, pagado a diez años. Se consideró un precio de venta de 10 MNX/kg. El estudio técnico-económico de los tratamientos mostró que la CUP fue 38% mayor para las plantas control en contraste con el mejor tratamiento biológico aplicado. El tratamiento de mayor rentabilidad fue el Bv 83 sustrato alta+foliar (65%), mientras que el de menor rentabilidad fue el control (20%). Debido a los mayores rendimientos obtenidos con el tratamiento Bv 83 sustrato alto+foliar, la rentabilidad fue 2 veces mayor que la del testigo comercial.

## 9. CONCLUSIONES

El componente biológico de Fungifree AB® (*B. subtilis* 83) fue reclasificada como una cepa de la especie *Bacillus velezensis* según un análisis filogenómico. *B. velezensis* 83 tiene una alta identidad genómica (ANI>98%) con *B. velezensis* FZB42, sin embargo, ambas cepas son fenotípicamente diferentes en cuanto a la producción de metabolitos relacionados con el control biológico. *B. velezensis* 83 (Fungifree AB®) controló la antracnosis en mangos Kent con la misma eficacia que los productos químicos Captan 50 PH® o Cupravit hidro®, se observó que en medios ricos de nutrientes (frutos de jitomate y medio de cultivo PDA) el factor de antagonismo contenido en Fungifree AB® con la principal contribución en la eficacia de control biológico de hongos fitopatógenos foliares fueron las esporas de *B. velezensis* 83 (las esporas al germinar se convierten en las células vegetativas que ejercen el control biológico). En medios limitados de nutrientes (como p. ej. en la superficie de las hojas) los metabolitos sí contribuyeron en la eficacia del producto Fungifree AB®. Se encontró que además del potencial genético de *B. velezensis* 83 para promover el crecimiento de plantas, la aplicación de Fungifree AB® a plantas de jitomate cultivado en invernadero incrementó la producción y la calidad de jitomate incrementando la rentabilidad del sistema de producción 2 veces más que la del testigo comercial. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales evaluadas en este trabajo, *B. velezensis* 83 tuvo la capacidad de ser PGPB para plantas de jitomate. Finalmente, los resultados de este trabajo respaldan la importancia de complementar el análisis genómico con los ensayos *in vitro* e *in vivo* para demostrar el efecto de control biológico y de promoción de crecimiento de plantas, aún entre cepas de alta identidad genómica.

## 10. PERSPECTIVAS

- 1) Realizar estudios para entender cómo *B. velezensis* 83 incrementa la producción de jitomate cultivado en condiciones de invernadero y saber si es a través del mejoramiento en la adquisición de nutrientes (p. ej. por actividad de la fitasa) o si es debido a la producción de compuestos fitoestimulantes (p. ej. auxinas).
- 2) Realizar estudios sobre los efectos que tiene *B. velezensis* 83 en la planta y en los frutos, incluyendo la evaluación de parámetros de crecimiento de la planta (p. ej. crecimiento de raíz, tallo, ramas, frutos, clorofila en hojas) y la caracterización bioquímica de los frutos (parámetros de calidad del fruto).

### La mayor parte de los resultados y aportaciones han sido publicados en (Anexo C):

- Balderas-Ruíz, K.A., Bustos, P., Santamaria, R.I., González, V., Cristiano-Fajardo, S.A., Barrera-Ortíz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á.A., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. (2020) *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*, 10(1):163. [https://doi: 10.1186/s13568-020-01101-8](https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8)
- Balderas-Ruíz, K. A., Gómez-Guerrero, C. I., Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Aranda-Ocampo, S., Juárez, A. M., Leyva, E., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2021). *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100076. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076>
- Serrano-Carreón, L., Aranda-Ocampo, S., Balderas-Ruíz, K.A., Juárez, A.M. Leyva, E., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Galindo, E. (2022) A case study of a profitable mid-tech greenhouse for the sustainable production of tomato, using a biofertilizer and a biofungicide. *Electronic Journal of Biotechnology*. 59: 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.003>

### Tesis dirigidas: 2 de Licenciatura

- Venegas-Brito, M. (2015). Evaluación de los factores de antagonismo presentes de un fungicida comercial a base de *Bacillus* sp 83, contra la antracnosis del mango, *Tesis de Licenciatura*. Ingeniería en Biotecnología. Universidad Técnica del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Gómez-Guerrero C.I. (2021). Evaluación de la eficacia biológica de *Bacillus velezensis* 83 contra *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de tomate. *Tesis de Licenciatura*. FCB-UAEM. Cuernavaca, Morelos.

### Participaciones en Congresos: 3 en la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

- XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Balderas-Ruíz, K.A., Gómez-Guerrero, C.I., Aranda-Ocampo, S. Juárez, A.M. Leyva, E., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Galindo, E. y Serrano-Carreón, L. *Bacillus velezensis* 83 incrementa la productividad del jitomate cultivado en invernadero y controla *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de jitomate. Modalidad virtual. México, 27 al 30 de Octubre de 2021.
- XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Colonización de *Bacillus amyloliquefaciens* 83 en follaje y en raíz de jitomate. Balderas K, Flores N, Flores C, Galindo E, y Serrano-Carreón L. Guadalajara, Jalisco, México, 25 al 30 de Junio de 2017.
- XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Detección y cuantificación específica de *Bacillus* sp 83 por qPCR. Balderas K, Flores N, Flores C, Galindo E, y Serrano-Carreón L. Guadalajara, Jalisco, México, 21 al 26 de Junio de 2015.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Abhilash, P. C., Dubey, R. K., Tripathi, V., Gupta, V. K., & Singh, H. B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnology*, 34(11): 847–850. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.05.005>
2. Abriouel, H., Franz, C. M., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1): 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
3. Akram, W., Anjum, T. & Ali, B. (2015). Co-cultivation of tomato with two *Bacillus* strains: effects on growth and yield. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 25(6): 1644-1651.
4. Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M. & Jacques, P. (2018). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(30): 29910–29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
5. Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H. P. & Beaugregard, P. B. (2016). *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *mBio* 7(6): e01664-16. <https://doi:10.1128/mBio.01664-16>
6. Allende, R., Juárez, C., García, R., Carrillo, a., Patiño, M., y Galindo, E. 2001. *Rhodotorula minuta*, agente de control biológico potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. *Brazilian Phytopathology*, 26 (supplement), august, pp. 461-462.
7. Alotaibi, F., Hijri, M. & St-Arnaud, M. (2021). Overview of approaches to improve rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *Applied Microbiology*, 1(2): 329–351. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol1020023>
8. Alvarez, F., Castro, M., Príncipe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G. & Jofré, E. (2012). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP<sub>2</sub>18 and ARP<sub>2</sub>3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 159-174.
9. Aragón-Gómez, W I. (2012). Desarrollo de un marcador molecular específico para el agente de control biológico *Bacillus* sp. 83. *Tesis de Maestría*. Depto. de Ingeniería Celular y Biotecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos.
10. Arnauteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R. & Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9): 600–614. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>
11. Arndt, D., Grant, J., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y. & Wishart, D.S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1): W16–W21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
12. Asari, S., Matzén, S., Petersen, M. A., Bejai, S. & Meijer, J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 92: fiw070-fiw070. <https://doi: 10.1093/femsec/fiw070>
13. Asari, S., Tarkowská, D., Rolčík, J., Novák, O., Palmero, D. V., Bejai, S. & Meijer, J. (2017). Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta*, 245: 15-30. <https://doi: 10.1007/s00425-016-2580-9>
14. Auchtung, J. M., Lee, C. A. & Grossman, A. D. (2006). Modulation of the ComA-dependent *quorum* response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides. *Journal of Bacteriology*, 188(14): 5273-5285. <https://doi:10.1128/JB.00300-06>
15. Balderas, K., Flores, N., Flores, C., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. (2015). Detección y cuantificación específica de *Bacillus* sp 83 por qPCR. Memorias del XVI Congreso SMBB. Guadalajara, Jalisco, México, 21 al 26 de Junio.
16. Balderas-Ruiz, K. A., Bustos, P., Santamaria, R. I., González, V., Cristiano-Fajardo, S. A., Barrera-Ortíz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á. A., Galindo, E. & Serrano-Carreón, L. (2020) *Bacillus velezensis*

- 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*, 10(1): 163. [https://doi: 10.1186/s13568-020-01101-8](https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8)
17. Balderas-Ruiz, K.A., Gómez-Guerrero, C.I., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Aranda-Ocampo, S. Juárez A.M., Leyva, E., Galindo, E. & Serrano-Carreón, L. (2021). *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment. *Current Research in Microbiology Sciences*, 2: 100076. [Sci https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076](https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076)
  18. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. & Pevzner, P.A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19: 455–477. <https://doi:10.1089/cmb.2012.0021>
  19. Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., & El Enshasy, H. (2021). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability*, 13: 1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
  20. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2008). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 37: D26-D31. <https://doi: 10.1093/nar/gkn723>
  21. Blake, C., Nordgaard Christensen, M., & Kovács, Á. T. (2020). Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, <https://doi:10.1094/mpmi-08-20-0225-cr>
  22. Borriss, R., Chen, X., Rueckert, C., Blom, J., Becke, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Spröer, C., Junge, H., Vater, J., Pühler, A. & Klenk, H. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 1786-1801. <https://doi:10.1099/ijs.0.023267-0>
  23. Borriss, R. (2016). Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: an update. In: Islam M., Rahman M., Pandey P., Jha C., Aeron A. (Eds.), *Bacilli and agrobiotechnology*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_8)
  24. Borriss, R. (2020a). Chapter 1. Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: an update. In book: *phyto-microbiome in stress regulation*. Kumar, M., Kumar, V., Prasad, R. (Eds.), Springer Nature, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2576-6_1)
  25. Borriss, R. (2020b). Chapter 7 - *Bacillus*. Eds. Amaresan, M. Senthil Kumar, K. Annapurna, Krishna Kumar, A. Sankaranarayanan, Academic Press. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 107–132. <https://doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00007-1>
  26. Brito, P. H., Chevreux, B., Serra, C. R., Schyns, G., Henriques, A. O., & Pereira-Leal, J. B. (2018). Genetic competence drives genome diversity in *Bacillus subtilis*. *Genome Biology and Evolution*, 10(1): 108–124, <https://doi.org/10.1093/gbe/evx270>
  27. Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2019). The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. *Food Microbiology*. <https://doi:10.1016/j.fm.2019.01.010>
  28. Cámara-Almirón, J., Navarro, Y., Díaz-Martínez, L., Magno-Pérez-Bryan, M. C., Molina-Santiago, C., Pearson, J. R., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D. (2020). Dual functionality of the amyloid protein TasA in *Bacillus* physiology and fitness on the phylloplane. *Nature Communications*, 11(1): 1859. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15758-z>
  29. Cao, M., Geng, W., Liu, L., Song, C., Xie, H., Guo, W., Jin, Y. & Wang, S. (2011). Glutamic acid independent production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Bioresource Technology*, 102: 4251-4257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.065>

30. Carrillo-Fasio, J.A., García-Estrada, R.S., Muy-Rangel, M.D., Sañudo-Barajas, A., Márquez-Zequera, I., Allende-Molar, R., de la Garza-Ruiz, Z., Patiño-Vera, M. y Galindo-Fentanes, E. (2005). Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23: 24-32.
31. Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., McQuillan, J. A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* (Oxford, England), 28: 464-469. [https://doi: 10.1093/bioinformatics/btr703](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703)
32. Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10: 302. [https://doi: 10.3389/fmicb.2019.00302](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302)
33. Chaudhari, N.M., Gupta, V.K. & Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific Reports*, 6: 24373-24373. [https://doi: 10.1038/srep24373](https://doi.org/10.1038/srep24373)
34. Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M. Junge, H. Mögel. G., Kunz, S. & Borriss, R. (2009). Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 140: 38-44.
35. Chen, X., Wang, Y., Gao, Y., Gao, T. & Zhang, D. (2019). Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *Plant Pathology Journal*, 35(5):425-436. [https://doi: 10.5423/PPJ.OA.03.2019.0064](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0064).
36. Chen, B., Wen, J., Zhao, X., Ding, J. & Qi, G. (2020). Surfactin: A *quorum-sensing* signal molecule to relieve CCR in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Frontiers in Microbiology*, 11: 631. doi: 10.3389/fmicb.2020.00631
37. Chen, L., Wang, X., Ma, Q., Bian, L., Liu, X., Xu, Y., Zhang, H., Shao, J. & Liu, Y. (2020). *Bacillus velezensis* CLA178-induced systemic resistance of *Rosa multiflora* against crown gall disease. *Frontiers in Microbiology*, 11: 587667. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587667>
38. Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6: 780. doi:10.3389/fmicb.2015.00780
39. Ciufu, S., Kannan, S., Sharma, S., Badretdin, A., Clark, K., Turner, S., Brover, S., Schoch, C. L., Kimchi, A., & DiCuccio, M. (2018). Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(7): 2386–2392. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>
40. Cristiano-Fajardo, S.A., Flores, C., Flores, N., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L. & Galindo, E. (2019). Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. *Journal of Biotechnology*, 299: 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.027>
41. Dean, R., Van-Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 414–430. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X>
42. Debois, D., Fernandez, O., Franzil, L., Jourdan, E., de Brogniez, A., Willems, L., Clément, C., Dorey, S., De Pauwa, E. & Ongena, M. (2015). Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. *Environmental Microbiology Reports*, 7(3): 570–582. [https://doi:10.1111/1758-2229.12286](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12286)
43. Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C. & Salzberg, S. L. (2007). Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23: 673-679. [https://doi: 10.1093/bioinformatics/btm009](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009)
44. Devi, S. N., Vishnoi, M., Kiehler, B., Haggett, L. & Fujita, M. (2015). *In vivo* functional characterization of the transmembrane histidine kinase KinC in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 161(Pt 5): 1092–1104. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000054>

45. Do, T. H., Suzuki, Y., Abe, N., Kaneko, J., Itoh, Y., & Kimura, K. (2011). Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly- $\gamma$ -glutamate synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23): 8249–8258. <https://doi.org/10.1128/AEM.05827-11>
46. Dunlap, C. A., Bowman, M. J. & Rooney, A. P. (2019). Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group – important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>
47. Dunlap, C. A., Kim, S. J., Kwon, S. W. & Rooney, A. P. (2015). Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 2104–2109. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.000226>
48. Dunlap, C. A., Kim, S. J., Kwon, S. W. & Rooney, A. P. (2016) *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(6): 1212–1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>
49. Dunlap, C.A. (2019). Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. *Biological Control*, 134: 82–86. [doi:10.1016/j.biocontrol.2019.04.011](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.04.011)
50. Elsholz, A. K., Wacker, S. A., & Losick, R. (2014). Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. *Genes & Development*, 28(15): 1710–1720. <https://doi.org/10.1101/gad.246397.114>
51. Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. & Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3): 251-258. Recuperado en 18 de enero de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802013000300010&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000300010&lng=es&tlng=es).
52. Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
53. Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., Borriss, R. (2018). *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
54. Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y. & Wang, Q. (2017). Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1973. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>
55. Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., & Matambo, T. (2021). Biopesticides in sustainable agriculture: a critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. *Frontiers in Sustainable Food System*, 5: 619058. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>
56. FIRA (2017). Panorama Agroalimentario: Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. Tomate rojo 2017. Consulta en línea 30/08/2018. En: [file: www.fira.gob.mx](http://www.fira.gob.mx)
57. Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285: 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
58. Galindo, E., Carrillo-Fasio, A., García-Estrada, R. S. & Patiño, M. (2005). Tecnologías para el control biológico de la principal enfermedad del mango (antracnosis) y el efecto en su calidad poscosecha. *Claridades Agropecuarias*, 148: 50-59.
59. Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M., Rayo, E., Isauro, D. & Jurado, C. (2013). The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16:5-5. <https://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>
60. Galitskaya, P.; Karamova, K.; Biktasheva, L.; Galieva, G.; Gordeev, A.; Selivanovskaya, S.(2022). Lipopeptides produced by *Bacillus mojavensis* P1709 as an efficient tool to maintain postharvest Cherry tomato quality and quantity. *Agriculture*: 12, 609. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050609>

61. Gallego del Sol, F. & Marina, A. (2013). Structural basis of Rap phosphatase inhibition by Phr peptides. *PLOS Biology*, 11(3): e1001511. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001511>
62. Gallegos-Monterrosa, R., Mhatre, E. & Kovács, Á. T. (2016). Specific *Bacillus subtilis* 168 variants form biofilms on nutrient-rich medium. *Microbiology*, 162(11): 1922-1932.
63. Gallegos-Monterrosa, R., Christensen, M.N., Barchewitz, T., Koppenhöfer, S., B. Priyadarshini, B., Bálint, B., Maróti, G., Kempen, P. J., Dragoš, A. & Kovács, A.T. (2021). Impact of Rap-Phr system abundance on adaptation of *Bacillus subtilis*. *Communications Biology*, 4: 468. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01983-9>
64. Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J. & Zhang, Y. (2017). Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 105:27-39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>
65. García-Gutiérrez, L., Zerriouh, H., Romero, D., Cubero, J., De Vicente, A. & Pérez-García, A. (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6: 264-274.
66. Gómez-Guerrero C.I. (2021). Evaluación de la eficacia biológica de *Bacillus velezensis* 83 contra *Botrytis cinerea* en hojas y frutos de tomate. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
67. González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Vinuesa, P., Juárez, S., Martínez-Flores, I., Cevallos, M.Á., Brom, S., Martínez-Romero, E. & Romero, D. (2019). Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. *Frontiers in Microbiology*, 10(910): 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00910>
68. Gordon, D., Abajian, C. & Green, P. (2013). Consed: a graphical editor for next-generation sequencing. *Bioinformatics*, 29: 2936-7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt515>
69. Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(Pt 1): 81–91. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64483-0>
70. Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H-S. & Patra J.K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206: 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
71. Graycar, T. P., Bott, R. R., Power, S. D. & Estell, D. A. (2013). Chapter 693 - Subtilisins. In: Rawlings ND and Salvesen G (eds) *Handbook of proteolytic enzymes* (3d Edn). Academic Press, pp 3148-3155
72. Gu, Y., Zheng, J., Feng, J., Cao, M., Gao, W., Quan, Y., ... Song, C. (2017). Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10): 4163–4174. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8171-2>
73. Guédon, E. & Martin-Verstraete, I. (2006). Cysteine metabolism and its regulation in bacteria. In: Wendisch V.F. (eds) *Amino acid biosynthesis ~ pathways, regulation and metabolic engineering*. Microbiol Monograph, vol 5. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7171\\_2006\\_060](https://doi.org/10.1007/7171_2006_060)
74. Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the subtilis and cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11): 5753–5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>
75. Hamoen, L. W., Venema, G., & Kuipers, O. P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 1), 9–17. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26003-0>
76. Hanif, A., Zhang, F., Li, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M., Zhang, M., Jia, D., Zhao, X., Liang, J., Majid, T., Yan, J., Farzand, A., Wu, H., Gu, Q. & Gao, X. (2019). Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins*, 11(5): 295. <https://doi.org/10.3390/toxins11050295>



77. Hanif, K., Hameed, S., Imran, A., Naqqash, T., Shahid, M. & Van Elsas, J.D. (2015). Isolation and characterization of a  $\beta$ -propeller gene containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato *Solanum tuberosum* L. *Frontiers in Microbiology*, 6: 583. [https://doi: 10.3389/fmicb.2015.00583](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00583)
78. Hao, K., He, P., Blom, J., Rueckert, C., Mao, Z., Wu, Y., He, Y. & Borriss, R. (2012). The genome of plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain YAU B9601-Y2 contains a gene cluster for mersacidin synthesis. *Journal of Bacteriology*, 194: 3264-3265. [https://doi: 10.1128/jb.00545-12](https://doi.org/10.1128/jb.00545-12)
79. He, Y., Pantigoso, H., Wu, Z. & Vivanco, J. (2019). Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *Journal of Applied Microbiology*, 127: 196-207. <https://doi.org/10.1111/jam.14273>
80. Hernández-Pacheco, C. E., Orozco-Mosqueda, M., Flores, A., Valencia-Cantero, E. & Santoyo, G. (2021). Tissue-specific diversity of bacterial endophytes in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.), and screening for their multiple plant growth-promoting activities. *Current Research in Microbial Sciences*, 2: 100028. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100028>
81. Hoff, G., Arguelles-Arias, A., Boubsi, F., Pršic, J., Meyer, T., Ibrahim, H.M.M., Steels, S., Luzuriaga, P., Legras, A., Franzil, L., Lequart-Pillon, M., Rayon, C., Osorio, V., de Pauw, E., Lara, Y., Deboever, E., de Coninck, B., Jacques, P., Deleu, M., Petit, E., Van Wuytswinkel, O. & Ongena, M. (2021). Surfactin stimulated by pectin molecular patterns and root exudates acts as a key driver of the *Bacillus*-plant mutualistic interaction. *mBio*, 12(6): e0177421. <https://doi.org/10.1128/mBio.01774-21>
82. Hsueh, Y. H., Huang, K. Y., Kunene, S. C. & Lee, T. Y. (2017). Poly- $\gamma$ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12): 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms18122644>
83. Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M. & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 20(6): 619-626. [https://doi: 10.1094/mpmi-20-6-0619](https://doi.org/10.1094/mpmi-20-6-0619)
84. Im, S. M., Yu, N. H., Joen, H. W., Kim, S. O., Park, H. W., Park, A. R., & Kim, J. C. (2020). Biological control of tomato bacterial wilt by oxydifficidin and difficidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163: 130-137. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.007>
85. Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M. Konstantinidis K, T. & Aluru S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9: 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
86. Jones, D. T., Taylor, W. R., Thornton, J. M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8(3): 275-282. [https://doi:10.1093/bioinformatics/8.3.275](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275)
87. Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P. & Ongena, M. (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 456-468.
88. Kalamara, M., Spacapan, M., Mandic-Mulec, I. & Stanley-Wall, N. R. (2018). Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Molecular Microbiology*, 110(6): 863-878. [https://doi:10.1111/mmi.14127](https://doi.org/10.1111/mmi.14127)
89. Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3): 250-256. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0250>
90. Keswani, C., Singh, S. P., Cueto, L., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Singh, S. P., Blázquez, M. A., & Sansinenea, E. (2020). Auxins of microbial origin and their use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20): 8549-8565. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10890-8>

91. Khatoon, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M. A., & Santoyo, G. (2020). Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *Journal of Environmental Management*, 273: 111118. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>
92. Kong, H. G., Kim, J. C., Choi, G. J., Lee, K. Y., Kim, H. J., Hwang, E. C., ... & Lee, S. W. (2010). Production of surfactin and iturin by *Bacillus licheniformis* N1 responsible for plant disease control activity. *The Plant Pathology Journal*, 26(2): 170-177. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.2.170>
93. Kumar, A., Prakash, A., Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems* (Maheshwari DK, ed), pp. 37-59. Springer Berlin Heidelberg
94. Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C. & Salzberg, S. L. (2004). Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, 5: R12. <https://doi:10.1186/gb-2004-5-2-r12>
95. Lahlali, R., Peng, G., Gossen, B.D., McGregor, L., Yu, F.Q., Hynes, R. K., Hwang, S. F., McDonald, M. R. & Boyetchko, S. M. (2013) Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. *Phytopathology*, 103: 245-254.
96. Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B. D., Hwang, S. F. & McDonald, M. (2011) Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. *Biocontrol Science and Technology*, 21: 1351-1362.
97. Li, F., Tang, M., Tang, X., Sun, W., Gong, J., & Yi, Y. (2019). *Bacillus subtilis*-*Arabidopsis thaliana*: a model interaction system for studying the role of volatile organic compounds in the interchange between plants and bacteria. *Botany*. <https://doi:10.1139/cjb-2019-0093>
98. Li, X-Y., Mao, Z-C., Wu, Y-X., Ho H-H., & He, Y-Q. (2015). Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Biocontrol Science Technology*, 25: 2, 132-143, <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2014.960809>
99. Liaqat, I., Ahmed, S. I. & Jahan, N. (2013). Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*. *International Journal of Microbiology Research and Reviews*, 4: 061-067.
100. Liu, J., He, D., Li, X. Z., Gao, S., Wu, H., Liu, W., Gao, X., Zhou, T. (2010).  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface. *International Journal of Food and Microbiology*, 142: 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.023>
101. Liu, J., Moore, S., Chen, C. & Lindsey, K. (2017). Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in *Arabidopsis* root development: from experiments to systems Modeling, and back again. *Molecular Plant*, 10(12): 1480–1496. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.002>
102. Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X.Z., Wu, H., Liu, W. & Gao, X. (2011). Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 1: 43-52.
103. Liu, J., Zhou, T., He, D., Li, X.Z., Wu, H., Liu, W. & Gao, X. (2011). Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*. *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 1: 43-52.
104. Marlow, V.L., Porter, M., Hobbey, L., Kiley, T.B., Swedlow, J.R., Davidson, F.A., & Stanley-Wall, N.R. (2014). Phosphorylated DegU manipulates cell fate differentiation in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Journal of Bacteriology*, 196(1): 16–27. <https://doi.org/10.1128/JB.00930-13>
105. Mitchell, A., Chang, H. Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R. & Finn, R. D. (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research*, 43 (Database issue): D213-D221. <https://doi: 10.1093/nar/gku1243>.
106. Mochizuki, M., Yamamoto, S., Aoki, Y. & Suzuki, S. (2012). Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biocontrol Science and Technology*, 22: 697-709.

107. Moghannem, S., Farag, M., Shehab, A. M., & Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian journal of microbiology*, 49(3): 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
108. Mohsin, M. Z., Omer, R., Huang, J., Mohsin, A., Guo, M., Qian, J., & Zhuang, Y. (2021). Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(3), 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.07.002>
109. Molina-Santiago, C., Pearson, J.R., Navarro, Y. *et al.* (2019). The extracellular matrix protects *Bacillus subtilis* colonies from *Pseudomonas* invasion and modulates plant co-colonization. *Nature Communications*, 10: 1919. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09944-x>
110. Mongkolthananuk, W. (2012). Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12): 1597–1604. <https://doi.org/10.4014/jmb.1204.04013>
111. Moore, D. & Dowhan, D. (2002). Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0201as59>
112. Msadek, T., Kunst, F., Klier, A., & Rapoport, G. (1991). DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *Journal of bacteriology*, 173(7), 2366–2377. <https://doi.org/10.1128/jb.173.7.2366-2377.1991>
113. Müller, S., Strack, S. N., Hoefler, B. C., Straight, P. D., Kearns, D. B., & Kirby, J. R. (2014). Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18): 5603–5610. <https://doi.org/10.1128/AEM.01621-14>
114. Murray, E. J., Kiley, T. B., & Stanley-Wall, N. R. (2009). A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behaviour. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 1), 1–8. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023903-0>
115. Naamala, J., & Smith, D. L. (2021). Microbial derived compounds are a promising approach to mitigating salinity stress in agricultural crops. *Frontiers in Microbiology*, 12: 765320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.765320>
116. Nordgaard, M., Mortensen, R., Kirk, N. K., Gallegos-Monterrosa, R. & Kovács, Á. T. (2021). Deletion of Rap-Phr systems in *Bacillus subtilis* influences *in vitro* biofilm formation and plant root colonization. *Microbiology Open*, 10: e1212. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1212>
117. Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33: 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
118. Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J. L. & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9: 1084-1090.
119. Oslizlo, A., Stefanic, P., Vatovec, S., Beigot Glaser, S., Rupnik, M. & Mandic-Mulec, I. (2015). Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizosphere. *Microbial Biotechnology*, 8(3): 527-540. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12258>
120. Peng, N., Cai, P., Mortimer, M., Wu, Y., Gao, C. & Huang, Q. (2020). The exopolysaccharide–eDNA interaction modulates 3D architecture of *Bacillus subtilis* biofilm. *BMC Microbiology* 20: 115. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01789-5>
121. Pérez-Carrascal, O. M., VanInsberghe, D., Juárez, S., Polz, M. F., Vinuesa, P. & González, V. (2016). Population genomics of the symbiotic plasmids of sympatric nitrogen-fixing *Rhizobium* species associated with *Phaseolus vulgaris*. *Environmental Microbiology*, 18: 2660-2676. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13415>
122. Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J. García-Juárez, P. & Macías-Rodríguez, L. (2017). *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma*, 254: 2201–2213. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1109-9>

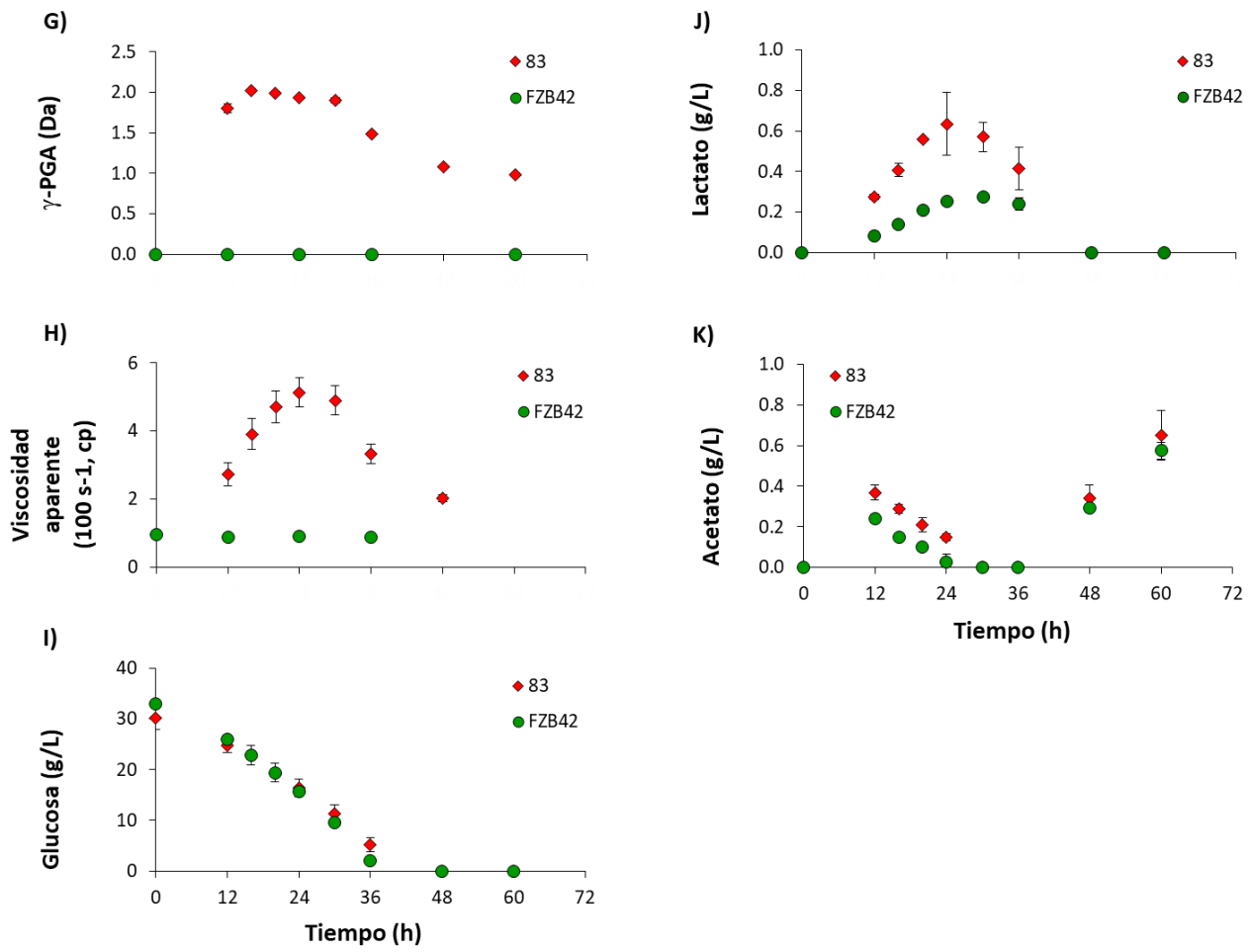
123. Pishchik, V. N., Vorobyev, N. I., Ostankova, Y. V., Semenov, A. V., Totolian, A. A., Popov, A. A., Khomyakov, Y.V., Udalova, O. R., Shibanov, D. V., Vertebny, V. E., Dubovitskaya, V. I., Sviridova, O. V., Walsh, O. S. & Shafian, S. (2018). Impact of *Bacillus subtilis* on tomato plants growth and some biochemical characteristics under combined application with humic fertilizer. *International Journal of Plant & Soil Sciences*, 22: 1-12. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2018/41148>
124. Poveda, J., & González-Andrés, F. (2021). *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(23): 8629–8645. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>
125. Rabbee, F. & Baek, K.H. (2020). Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules*, 25(21): 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>.
126. Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C. & Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6): 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
127. Rahman, F. B., Sarkar, B., Moni, R. & Rahman, M. S. (2021). Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 32: e00686. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00686>
128. Rahmer, R., Morabbi Heravi, K. & Altenbuchner, J. (2015). Construction of a super-competent *Bacillus subtilis* 168 using the PmtIA-comKS Inducible Cassette. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01431>
129. Ramavath, K., Hameeda, B., Reddy, G., 2019. Enhancement of plant growth in tomato by inoculation with plant growth promoting *Bacillus* spp. *World Journal of Agricultural Research*, 7(2): 69-75.
130. Reva, O. N., Swanevelder, D. Z. H., Mwita, L. A., Mwakilili, A. D., Muzondiwa, D., Joubert. M., Chan, W.Y., Lutz, S., Ahrens., C. H., Avdeeva, L.V., Kharkhota, M.A., Tibuhwa, D., Lyantagaye, S., Vater, J., Borriss, R. & Meijer, J. (2019). Genetic, epigenetic and phenotypic diversity of four *Bacillus velezensis* strains used for plant protection or as probiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02610>
131. Schmitz, S., Hofmann, A., Szekat, C., Rudd, B., Bierbaum, G. (2006). The lantibiotic mersacidin is an autoinducing peptide. *Applied Environmental Microbiology*, 72:7270–7277. <https://doi.org/10.1128/aem.00723-06>
132. Schultz, D., Wolynes, P. G., Ben Jacob, E., Onuchic, J. N. (2009). Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50): 21027-21034. <https://doi:10.1073/pnas.0912185106>
133. Serrano-Carreón, L. & Galindo, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 58: 77-88
134. Serrano-Carreón, L., Aranda-Ocampo, S., Balderas-Ruíz, K.A., Juárez, A.M. Leyva, E., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Galindo, E. A case study of a profitable mid-tech greenhouse for the sustainable production of tomato, using a biofertilizer and a biofungicide. *Electronic Journal of Biotechnology*. EJBTD-21-00264R2. Aceptado (01/jun/2022).
135. Sha, Y., Sun, T., Qiu, Y., Zhu, Y., Zhan, Y., Zhang, Y., Xu, Z., Li, S., Feng, X., Xu, H. (2019). Investigation of glutamate dependence mechanism for poly- $\gamma$ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis* on the basis of transcriptome analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67:6263-6274. <https://doi: 10.1021/acs.jafc.9b01755>
136. Siguier, P., Filée, J., Chandler, M. (2006). Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 526-531. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.005>
137. Solis-Arcos, Y. (2010). Identificación parcial de antibióticos ciclo-lipopéptídicos termorresistentes producidos por *Bacillus subtilis* 83 con actividad antifúngica contra *Fusarium* spp. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
138. Srivastava, D. A., Arya, G. C., Pandaranayaka, E. P., Manasherova, E., Prusky, D., Elad, Y., Frenkel, O. & Harel, A. (2020). Transcriptome profiling data of *Botrytis cinerea* infection on whole plant *Solanum lycopersicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(9): 1103-1107. <https://doi:10.1094/mpmi-05-20-0109-a>

139. Reyes-Perez, J. J., Hernandez-Montiel, L. G., Vero, S., Noa-Carrazana, J. C., Quiñones-Aguilar, E. E., & Rincón-Enríquez, G. (2019). Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11): 4992–4999. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03971-8>
140. Richter, M., Rosselló-Móra, R., Glöckner, F. & Peplies, J. (2016). JSpecies WS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6): 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
141. Romero, D. (2013). Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*, 164: 788-798. <https://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.004>
142. Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M. & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 4: 430-40.
143. Ryu, C. M., Hu, C. H., Locy, R.D. & Kloepper, J. W. (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil*, 268: 285-292. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0301-9>
144. Samaras, A., Hadjipetrou, C. & Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* strain QST713 may contribute to the management of SDHIs resistance in *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, <https://doi.org/10.1002/ps.6145>
145. Saraf, M., Jha, C. K. & Patel, D. (2010). The role of ACC deaminase producing PGPR in sustainable agriculture. In: Maheshwari, D. (eds). *Plant growth and health promoting bacteria*. Microbiology Monographs, vol 18. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_16)
146. Sarwar, A., Hassan, M. N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A. & Hafeez, F. Y. (2018). Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological Research*, 209: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006>
147. Saxena, A. K., Kumar, M., Chakdar, H., Anuroopa, N., & Bagyaraj, D. J. (2019). *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition. *Journal of Applied Microbiology*, doi:10.1111/jam.14506
148. Stein, T., Borchert, S., Kiesau, P., Heinzmann, S., Klöss, S., Klein, C., Helfrich, M., Entian, K.D. (2002). Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 44:403–416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02869>
149. Stoll, A., Salvatierra-Martínez, R., González, M. & Araya, M. (2021). The role of surfactin production by *Bacillus velezensis* on colonization, biofilm formation on tomato root and leaf surfaces and subsequent protection (ISR) against *Botrytis cinerea*. *Microorganisms*, 9: 2251. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112251>
150. Tahir, H. A., S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., Colman, M. V. & Gao, X. (2017). Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology*, 8: 171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00171>
151. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
152. Tan, I. S. & Ramamurthi, K. S. (2013). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, 6: 212-25. <https://dx.doi.org/10.1111/2F1758-2229.12130>
153. Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q. & Xu, Y. (2013). The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 64: 15–22. doi:10.1016/j.apsoil.2012.10.011
154. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 33-36. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
155. Tian, L., Lin, X., Tian, J., Ji, L., Chen, Y., Tran, L-SP. & Tian, C. (2020). Research advances of beneficial microbiota associated with crop plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1792. <https://doi.org/10.3390/ijms21051792>

156. Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. & Aronsson, A-C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Sciences*, 8: 49. [https://doi: 10.3389/fpls.2017.00049](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049)
157. Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V. & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1315. [https://doi:10.3389/fmicb.2018.01315](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315)
158. Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T. & Singh, B. K. (2020). Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18 (11): 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>
159. Tsukanova, K. A., Meyer, J. J. M. & Bibikova, T. N. (2017). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany*, 113: 91-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>
160. Vaikuntapu, P. R., Dutta, S., Samudrala, R.B., Rao, V.R., Kalam, S. & Podile, A.R. (2014). Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian Journal of Microbiology*, 54: 403-412. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0470-z>
161. Vardharajula, Sandhya & Ali, S. Z. (2014). Exopolysaccharide production by drought tolerant *Bacillus* spp. and effect on soil aggregation under drought stress. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4: 51-57. <https://10.15414/jmbfs.2014.4.1.51-57>
162. Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. & Nasrulhaq, B. A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—A Review. *Molecules*, 21: 573. [https://doi: 10.3390/molecules21050573](https://doi.org/10.3390/molecules21050573)
163. Venegas-Brito, M. (2015). Evaluación de los factores de antagonismo presentes de un fungicida comercial a base de *Bacillus* sp 83, contra la antracnosis del mango, *Tesis de Licenciatura*. Ingeniería en Biotecnología. Universidad Técnica del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
164. Verbon, E. H. & Liberman, L. M. (2016) Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science*, 21: 218-229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
165. Verhamme, D. T., Kiley, T. B., & Stanley-Wall, N. R. (2007). DegU co-ordinates multicellular behaviour exhibited by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 65(2), 554–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05810.x>
166. Vorholt, J. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 828–840 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
167. Vu, T.H.N.; Quach, N.T.; Nguyen, N.A.; Nguyen, H.T.; Ngo, C.C.; Nguyen, T.D.; Ho, P.-H.; Hoang, H.; Chu, H.H.; Phi, Q.-T. (2011) Genome Mining Associated with Analysis of Structure, Antioxidant Activity Reveals the Potential Production of Levan-Rich Exopolysaccharides by Food-Derived *Bacillus velezensis* VTX20. *Applied Sciences*, 11: 7055. <https://doi.org/10.3390/app11157055>
168. Wang, Y., Zhang, C., Liang, J., Wu, L., Gao, W. & Jiang, J. (2020). Iturin A extracted from *Bacillus subtilis* WL-2 affects *Phytophthora infestans* via cell structure disruption, oxidative stress, and energy supply dysfunction. *Frontiers in Microbiology*, 11: 536083. [https://doi: 10.3389/fmicb.2020.536083](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.536083)
169. Wang, X., Gao, X., Liu, Y., Fan, S. & Ma. Q. (2020). Progress of research on the regulatory pathway of the plant shade-avoidance syndrome. *Frontiers in Plant Science*: 11:439. doi: 10.3389/fpls.2020.00439
170. Wu, Y., Zhou, J., Li, C. & Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiology Open*, 8(8): e00813. <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>
171. Xu, M., Sheng, J., Chen, L., Men, Y., Gan, L., Guo, S. & Shen, L. (2014). Bacterial community compositions of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* HYT-12-1 on tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 835-845. [https://doi: 10.1007/s11274-013-1486-y](https://doi.org/10.1007/s11274-013-1486-y)
172. Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q. & Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3): 808-815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>
173. Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J., Kwon, S. & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10): 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>

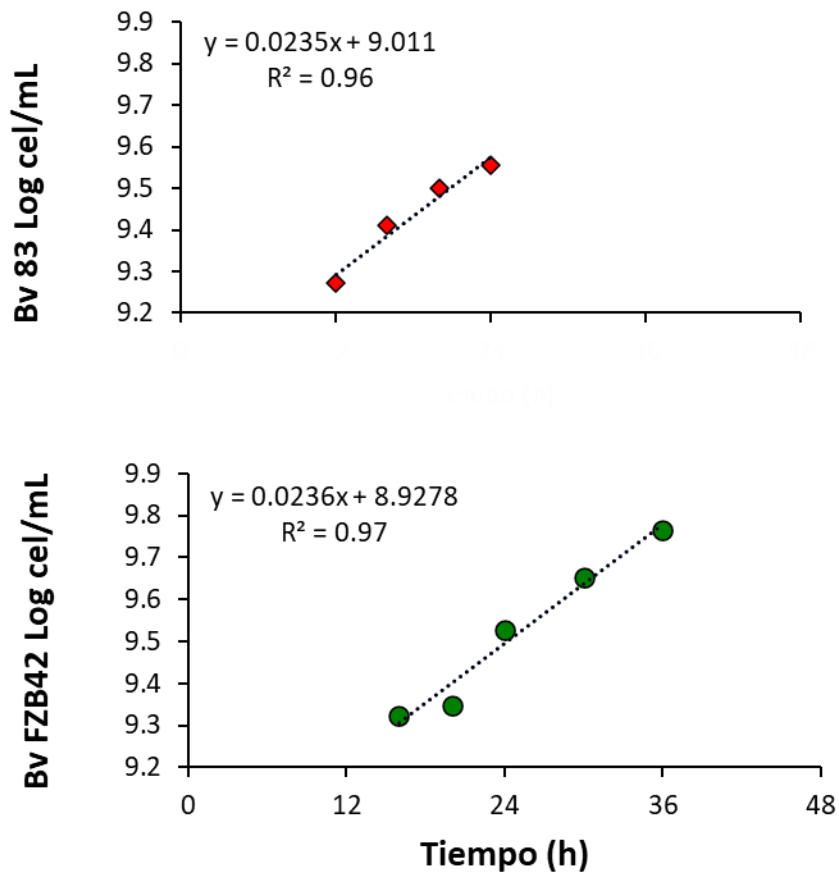
174. Yuan, J., Li, B., Zhang, N., Waseem, R., Shen, Q. & Huang, Q. (2012). Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2976-2981. <https://doi.org/10.1021/jf204868z>
175. Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A. & Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental Microbiology*, 16: 2196–2211. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12271>
176. Zhao, P., Quan, C., Jin, L., Wang, L., Wang, J. & Fan, S. (2013). Effects of critical medium components on the production of antifungal lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 exhibiting excellent biosurfactant properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3): 401–409. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1180-5>
177. Zhi, Y., Wu, Q. & Xu, Y. (2017). Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Scientific Reports*, 7: 40976. <https://doi:10.1038/srep40976>
178. EPA (United States Environmental Protection Agency). Abril del 2022. Biopesticide Active ingredients, US EPA. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/biopesticide-active-ingredients>
179. FAOSTAT, Abril del 2021. Datos sobre alimentación y agricultura. Datos: cultivos y productos de ganadería. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
180. gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. Abril del 2022. <https://rdr.io/cran/gplots>
181. LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). Abril del 2022. Genus: *Bacillus* - LPSN. <https://lpsn.dsmz.de/genus/bacillus>
182. NCBI (National Center for Biotechnology Information). Abril del 2022. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>
183. SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) 2022. Abril del 2022. Consulta de registros sanitarios de plaguicidas, nutrientes vegetales y LMR. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
184. SnapGene, Abril del 2022. <https://www.snapgene.com>
185. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Agosto del 2022. Anuario estadístico de la producción agrícola (<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>).

## ANEXO A



**Figura A1-1.** Producción de metabolitos secundarios en cultivo líquido: G)  $\gamma$ -PGA (Da), H) viscosidad aparente ( $100 \text{ s}^{-1}$ , cp), I) glucosa (g/L), J) lactato (g/L) y K) acetato (g/L).





**Figura A1-2.** Velocidad específica de crecimiento de *B. velezensis* 83 y *B. velezensis* FZB42 calculada de la fase de crecimiento exponencial en el medio líquido y las condiciones de cultivo descritas en la sección 7.1.2.

Ecuación de la pendiente:

$$y = mx + b$$

por lo tanto:

$$\ln x = \mu t + \ln x_0$$

## ANEXO B

Análisis de rentabilidad de económica de los tratamientos con Bv 83 en jitomate cultivado en invernadero.

Tratamientos	Bv 83 sustrato baja	Bv 83 sustrato alta	Control
Jitomate (kg/planta)	3.76	4.54	3.28
CUP (MXN/kg jitomate)	7.3849	6.0610	8.3668
<b>COSTOS VARIABLES</b>	4.6972	3.9893	5.2808
<b>SEMILLA (Tomate saladette)</b>	0.5788	0.4792	0.6641
<b>AGROQUIMICOS</b>	0.7252	0.7010	0.7269
<b>Insecticidas</b>	0.0908	0.0752	0.1042
<b>Convencional</b>	0.0800	0.0662	0.0918
Neonicotinoides	0.0053	0.0044	0.0060
Piriproxifeno	0.0279	0.0231	0.0320
Flupiradifurona	0.0468	0.0388	0.0537
<b>Orgánicos</b>	0.0108	0.0089	0.0124
Aceite de soya	0.0070	0.0058	0.0080
Extracto de Argemonina y berberina	0.0017	0.0014	0.0020
Jabón	0.0021	0.0017	0.0024
<b>Fungicidas</b>	0.1069	0.1890	0.0174
<b>Convencional</b>	0.0034	0.0028	0.0174
Carbamatos (Previcur energy®)	0.0034	0.0028	0.0039
Sulfúro (Velsul 725®)	-	-	0.0136
<b>Biológico</b>	0.1035	0.1862	-
<i>B. velezensis</i> 83 (Fungifree A&B®)	0.1035	0.1862	-
<b>Bactericida</b>	0.0058	0.0048	0.0066
<b>Convencional</b>	0.0058	0.0048	0.0066
Sales cuaternarias de amonio	0.0058	0.0048	0.0066
<b>Bioestimulante</b>	0.3682	0.3048	0.4224
<b>Raíz</b>	0.0386	0.0320	0.0443
Ácido 1-Naftilacético (ANA)+	0.0113	0.0094	0.0130
Ácido Indol 3-butírico (IBA)	0.0041	0.0034	0.0047
Citocininas+Auxinas	0.0048	0.0039	0.0055
N-P-K+Amino ácidos	0.0083	0.0068	0.0095
Elementos traza	0.0102	0.0084	0.0117
<b>Foliar</b>	0.0686	0.0568	0.0787
N-P-K (20-30-10)	0.0143	0.0118	0.0164
N-K-C org	0.0243	0.0201	0.0278
N-K-C org + Fe	0.0266	0.0220	0.0305
B+Cu+Fe	0.0006	0.0005	0.0006
Agentes quelantes	0.0029	0.0024	0.0033

Tratamientos	Bv 83	Bv 83	Control
	sustrato baja	sustrato alta	
<b>Fruta</b>	<b>0.2609</b>	<b>0.2160</b>	<b>0.2994</b>
Ca+B+amino ácidos	0.0127	0.0106	0.0146
Calcio	0.0048	0.0040	0.0055
Aminoácidos libres	0.0327	0.0270	0.0375
Boro	0.0018	0.0015	0.0021
N-P-K (5-15-45)	0.0125	0.0104	0.0144
Cit+Gib+Aux+ Vitaminas	0.0744	0.0616	0.0853
Citocininas	0.1220	0.1010	0.1400
<b>Asimilación de nutrientes</b>	<b>0.0700</b>	<b>0.0579</b>	<b>0.0803</b>
Ácido fúlvico	0.0700	0.0579	0.0803
<b>Acidificante</b>	<b>0.0837</b>	<b>0.0693</b>	<b>0.0960</b>
Ácido inorgánico	0.0837	0.0693	0.0960
<b>FERTILIZANTES</b>	<b>2.0831</b>	<b>1.7245</b>	<b>2.3899</b>
<b>Convencional</b>	<b>2.0831</b>	<b>1.7245</b>	<b>2.3899</b>
<b>Nitrógeno</b>	<b>1.0050</b>	<b>0.8320</b>	<b>1.1530</b>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.4026	0.3333	0.4619
KNO <sub>3</sub>	0.6024	0.4987	0.6911
<b>Fosfato</b>	<b>0.2289</b>	<b>0.1895</b>	<b>0.2626</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2289	0.1895	0.2626
<b>Potasio</b>	<b>0.1114</b>	<b>0.0923</b>	<b>0.1279</b>
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1114	0.0923	0.1279
<b>Complejos</b>	<b>0.2116</b>	<b>0.1752</b>	<b>0.2428</b>
Elementos traza	0.2116	0.1752	0.2428
<b>Otros compuestos</b>	<b>0.5262</b>	<b>0.4356</b>	<b>0.6037</b>
MgSO <sub>4</sub>	0.0806	0.0667	0.0925
Fe	0.1705	0.1411	0.1956
B	0.0212	0.0176	0.0243
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.2451	0.2029	0.2811
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0088	0.0073	0.0102
<b>Otros</b>	<b>0.0103</b>	<b>0.0086</b>	<b>0.0089</b>
<b>Material de monitoreo de plagas</b>	<b>0.0081</b>	<b>0.0067</b>	<b>0.0069</b>
Pegamento plástico	0.0013	0.0011	0.0011
Trampas cromáticas	0.0067	0.0056	0.0058
<b>Combustible</b>	<b>0.0023</b>	<b>0.0019</b>	<b>0.0020</b>
Gasolina	0.0015	0.0013	0.0013
Aditivo para gasolina	0.0008	0.0006	0.0007
<b>Jornal</b>	<b>1.2997</b>	<b>1.0760</b>	<b>1.4911</b>
Jornalero	1.2997	1.0760	1.4911

Tratamientos	Bv 83 sustrato baja	Bv 83 sustrato alta	Control
<b>COSTOS FIJOS</b>	2.6877	2.0717	3.0860
<b>ACCESORIOS Y HERRAMIENTAS</b>	0.4256	0.1990	0.4907
Accesorios para tutoreo de plantas	0.0697	0.0577	0.0799
Anillos	0.0085	0.0071	0.0098
Ganchos	0.0427	0.0354	0.0490
Rafia	0.0184	0.0152	0.0211
Material para trabajo cultural	0.0071	0.0059	0.0082
Tijeras para podar	0.0071	0.0059	0.0082
Material para cosecha	0.0088	0.0073	0.0125
Cajas plásticas	0.0071	0.0059	0.0106
Cubetas	0.0017	0.0014	0.0019
Material para monitoreo	0.0045	0.0037	0.0052
Termo-higrómetro	0.0008	0.0007	0.0009
pH y conductividad	0.0037	0.0031	0.0042
Material de medición	0.0004	0.0003	0.0005
Probeta (100 mL)	0.0002	0.0001	0.0002
Vaso de precipitados (500 mL)	0.0002	0.0002	0.0003
Material para fumigación	0.0145	0.0120	0.0166
Bomba de aspersión manual	0.0024	0.0019	0.0027
Bomba de aspersión motorizada	0.0121	0.0100	0.0139
Maceta	0.0797	0.0659	0.0914
Bolsas negras de Polietileno (40*40)	0.0797	0.0659	0.0914
Material para sustrato	0.2409	0.0499	0.2764
Tezontle	0.0809	0.0167	0.0928
Fibra de coco	0.1600	0.0331	0.1836
<b>SERVICIOS</b>	2.2621	1.8728	2.5953
Renta del invernadero	0.0475	0.0393	0.0545
Amortización de la inversión fija	2.1007	1.7391	2.4101
Asistencia técnica	0.1139	0.0943	0.1307
<b>PRECIO DE VENTA</b>	<b>10.0</b>	<b>10.0</b>	<b>10.0</b>
Ingresos/ventas	2,106,248	2,544,150	1,835,877
Ganancia/Ha	550,811	1,002,137	299,840
<b>RENTABILIDAD (%/Ha)</b>	<b>35%</b>	<b>65%</b>	<b>20%</b>

## ANEXO C


- Balderas-Ruíz, K.A., Bustos, P., Santamaria, R.I., González, V., Cristiano-Fajardo, S.A., Barrera-Ortíz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á.A., Galindo, E., Serrano-Carreón, L. (2020) *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express*, 10(1):163. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>
- Balderas-Ruíz, K. A., Gómez-Guerrero, C. I., Trujillo-Roldán, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Aranda-Ocampo, S., Juárez, A. M., Leyva, E., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2021). *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100076. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076>
- Serrano-Carreón, L., Aranda-Ocampo, S., Balderas-Ruíz, K.A., Juárez, A.M. Leyva, E., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Galindo, E. (2022) A case study of a profitable mid-tech greenhouse for the sustainable production of tomato, using a biofertilizer and a biofungicide. *Electronic Journal of Biotechnology*. 59: 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.003>

ORIGINAL ARTICLE

Open Access



# *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion

Karina A. Balderas-Ruiz<sup>1</sup>, Patricia Bustos<sup>2</sup>, Rosa I. Santamaria<sup>2</sup>, Víctor González<sup>2</sup>, Sergio Andrés Cristiano-Fajardo<sup>1</sup>, Salvador Barrera-Ortiz<sup>3</sup>, Miriam Mezo-Villalobos<sup>4</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>5</sup>, Ángel Arturo Guevara-García<sup>3</sup>, Enrique Galindo<sup>1</sup> and Leobardo Serrano-Carreón<sup>1\*</sup> 

## Abstract

*Bacillus velezensis* 83 was isolated from mango tree phyllosphere of orchards located in El Rosario, Sinaloa, México. The assessment of this strain as BCA (biological control agent), as well as PGPB (plant growth-promoting bacteria), were demonstrated through in vivo and in vitro assays. In vivo assays showed that *B. velezensis* 83 was able to control anthracnose (Kent mangoes) as efficiently as chemical treatment with Captan 50 PH™ or Cupravit hidro™. The inoculation of *B. velezensis* 83 to the roots of maize seedlings yielded an increase of 12% in height and 45% of root biomass, as compared with uninoculated seedlings. In vitro co-culture assays showed that *B. velezensis* 83 promoted *Arabidopsis thaliana* growth (root and shoot biomass) while, under the same experimental conditions, *B. velezensis* FZB42 (reference strain) had a suppressive effect on plant growth. In order to characterize the isolated strain, the complete genome sequence of *B. velezensis* 83 is reported. Its circular genome consists of 3,997,902 bp coding to 3949 predicted genes. The assembly and annotation of this genome revealed gene clusters related with plant-bacteria interaction and sporulation, as well as ten secondary metabolites biosynthetic gene clusters implicated in the biological control of phytopathogens. Despite the high genomic identity (> 98%) between *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42, they are phenotypically different. Indeed, in vitro production of compounds such as surfactin and bacillomycin D (biocontrol activity) and  $\gamma$ -PGA (biofilm component) is significantly different between both strains.

**Keywords:** *Bacillus velezensis* 83, Genome sequencing, Biological control agent, PGPB, Secondary metabolites production

## Keypoints

*B. velezensis* 83 is a biological control agent and plant growth-promoting bacteria. Phylogenomic analysis allowed to reclassify *B. subtilis* 83 as *B. velezensis* 83. *B. velezensis* 83 has genes to establish a rhizosphere plant-bacteria interaction.

## Introduction

*Bacillus* is a bacterial genus which comprises several species that establish, directly or indirectly, beneficial relations with plants (Olanrewaju et al. 2017). By direct mechanisms some *Bacillus* strains promote plant growth, by improving the acquisition of nutrients such as nitrogen and phosphate (biofertilization), or through the production of phytohormones (biostimulants) such as IAA (indol acetic acid), enzymes such as ACC deaminase (1-amylocyclopropane-1-carboxylate deaminase) or volatile organic compounds (VOC) such as 2,3-butanediol and acetoin (Xu et al. 2014; Hanif et al. 2015; Asari et al. 2016, 2017; Vejan et al. 2016). On the other hand,

\*Correspondence: leobardo@ibt.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C. P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México

Full list of author information is available at the end of the article

through indirect mechanisms (production of antimicrobial compounds), they naturally exercise biological control over several phytopathogenic bacteria such as *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oxonopodis*, *Erwinia amylovora* and fungal pathogens as *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* and *Penicillium expansum* (Fira et al. 2018). *Bacillus* spp. biological control mechanisms include competition for nutrient and space, antibiosis or induced systemic resistance (ISR), which alone or together can reduce incidence and/or severity of plant diseases (Kloepper et al. 2004; Ongena and Jacques 2007; Choudhary and Johri 2009; Mongkolthanasarakul 2012; Fan et al. 2018).

Genome sequencing strategies complemented with the analysis of secondary metabolite gene cluster profiles of several *Bacillus* strains have been helpful in order to identify potential biological control agents (BCA) or plant growth-promoting bacteria (PGPB); but also to estimate their disease prevention and beneficial plant interaction potential (Borriss et al. 2011; Niazi et al. 2014; Palazzini et al. 2016; Cai et al. 2017; Belbahri et al. 2017; Fan et al. 2018; Chen et al. 2019). As part of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis* and *Bacillus velezensis*), *B. velezensis* species has been recognized as a plant-associated bacteria due to the presence of nine gene clusters encoding enzymes involved in the nonribosomal synthesis of lipopeptides (surfactin, bacillomycin D, fengycin) and polyketides (macrolactin, bacillaene, difficidin), a siderophore (bacilibactin), a dipeptide (bacilysin) and a putative peptide with nematocidal activity (Chen et al. 2007; Fan et al. 2017; Rabbee et al. 2019). Other genes involved in carbohydrate metabolism and plant cell wall degradation, such as amylase E (*amyE*), cellulase (*bglC*), xylanase (*xynACD*), galactokinase (*gal1*), and betaglucanase (*bglCS*) are also exclusively present in *Bacillus* strains associated to plants (Borriss et al. 2011). *B. velezensis* strains can show high genomic homology with phenotypic similarities, or differences, such as nutritional requirements, ability to colonize plants or production of antimicrobial metabolites (therefore antagonistic in vitro and in vivo activity) because they respond differently to stimuli from the habitat to which they are exposed. For example, the strains *B. velezensis* UCMB5044 (a oligotrophic PGPR isolated from desert soils), *B. velezensis* UCMB5113 and *B. velezensis* At1 (both strain plant endophytes) and *B. velezensis* UCMB55007 (a copiotroph isolated from calf gut) share 99% of genetic homology. However, their gene expression in response to root maize exudates were significantly different because they possess different DNA methylation patterns (Reva et al. 2019).

*B. velezensis* 83, is an aerobic, gram positive, rod shaped and spore forming bacteria isolated by our research team from the mango tree phyllosphere of orchards located in El Rosario, Sinaloa, México. This strain is the biological component of Fungifree AB™ marketed in México since 2012, as a foliar fungicide, very effective for the biocontrol of five different genera of phytopathogenic fungi (*Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca* and *Leveillula*) in crops of high agricultural importance such as mango, avocado, papaya, citrus, tomato, blueberry, blackberry, raspberry, zucchini, melon, cucumber, watermelon and others (Galindo et al. 2013). Here, we reported in vivo assays to demonstrate the activity of this strain as BCA (mango) as well as PGPB (maize). We have shown that *B. velezensis* 83 is an efficient strain for controlling mango anthracnose as well as a potent plant growth promoter agent in maize and *A. thaliana*. In addition, in vitro production by this strain of key compounds such as surfactin, bacillomycin D (biocontrol activity), acetoin and 2,3-butanediol, and particularly  $\gamma$ -PGA (biofilm component), was characterized, and helped to understand the mechanisms by which this strain exerts its action as a biofungicide and plant growth promoter. The genome sequence of *B. velezensis* 83, including genome assembly and annotation is also reported.

*B. velezensis* FZB42 was used as a reference for plant growth promotion and biological control strain (Fan et al. 2018). We show a comparison of metabolic and biological activities between *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 (> 98% genome identity) under in vitro conditions. However, as shown in this paper, a high genomic homology with a well characterized BCA strain is only the first step to fully characterize a newly isolate as BCA. The strain characterized in this work (*B. velezensis* 83), exhibited unique phenotypical traits in terms of biocontrol and growth promoting activities when compared with *B. velezensis* FZB42.

## Materials and methods

### Bacteria

*B. velezensis* 83 strain was deposited at Belgian Coordinated Collection of Micro-organisms (BCCM) by our research team under the accession number LMG S-30921. *B. velezensis* 83 was grown in 500 mL shake flasks containing 50 mL of Luria Bertani (LB) medium and incubated at 29 °C and 200 rpm for 12 h. Genomic DNA was isolated using a commercial kit (Quiagen). For the biocontrol and plant growth promotion assays, *B. velezensis* 83 was used as powder commercial formulation (Fungifree AB™ obtained from Agro&Biotecnica S. de R.L. de C.V.). *B. velezensis* FZB42 (BGSC 10A6, DSM23117) was kindly donated by Nord Reet UG Greifswald (Germany).



### Biological control and PGPB assays

A trial for biological control of mango anthracnose caused by *C. gloeosporioides* was done in a mango production orchard in El Rosario, Sinaloa, México. An experimental randomized block design was established with six treatments and four repetitions. The experimental unit was a mango Kent tree with more than 10 years old. In the experimental design, three *B. velezensis* 83 treatments (Fungifree AB™ in 1, 2 or 3 g/L), two chemical treatments (Captan 50™ in 300 g/L, and Cupravit hidro™ in 400 g/L) and a control (without treatment) were included. The treatments were applied to the foliage with a motorized-spray backpack. Four liters of the corresponding treatment were applied once a month in each tree from the beginning of flowering to the harvest of the fruits (six applications in total). Twelve fruits were taken from each experimental unit and stored (under commercial conditions) for 21 days, then the severity of anthracnose at postharvest was evaluated. The evaluation of severity and control efficacy obtained with each treatment was done using a visual hedonic scale, where: (0) healthy fruit, (1) <2 mm spots, (2) <5%, (3) <12.5%, (4) <25%, (5) <50% and (6) >50% of affected area in the mango fruit. The data collected were transformed to obtain the percentage of severity by means of the Eq. 1. (Townsend and Heuberger 1943):

$$P = \left[ \frac{\sum n.v}{N.C} \right] \times 100 \quad (1)$$

where:

P = severity (%).

n = number of samples per category.

v = numerical value of the category.

N = total number of samples.

C = highest category.

After that, the control efficacy of each treatment was calculated by Eq. 2. (Abbott, 1925):

$$Efficacy(\%) = \left[ IT - \left( \frac{it}{IT} \right) \right] \times 100 \quad (2)$$

where:

IT = severity (%) in the control.

it = severity (%) in the treatment.

### Plant growth promoting assays

Maize growth promotion study was carried out under greenhouse conditions. First of all, the seeds were disinfected by immersion in 1% NaClO aqueous solution for 1 min followed by three rinses with sterile distilled water. *B. velezensis* 83 was tested with two different treatments: 1) as a seed treatment or 2) as root treatment of

seedlings. For seed treatment, the seeds were immersed in Fungifree AB™ aqueous solution (using 10 g/kg seed) during 2 h then sown in sterile substrate (peat moss: black earth, 3:1). For root treatment, Fungifree AB™ (at a dose equivalent to 2.5 kg/ha) was applied to each pot seedling at 10 and 22 days after sowing (DAS). For each treatment, 30 seeds or seedlings were used. For the control treatment, only distilled water was applied and the same quantity of seeds or seedlings was used. The evaluation of length shoot, dry weight (DW) of shoot and root was carried out with a sample of 15 plants at 37 DAS.

Another assay to show the plant growth promoting effects caused by *B. velezensis* 83 was done with in vitro co-cultures with *A. thaliana* (Col-0) seedlings and comparing with those effects caused by *B. velezensis* FZB42 and against a control (uninoculated plants). The seeds were disinfected and sown in aseptic conditions to obtain seedlings (Barrera-Ortiz et al. 2018). *A. thaliana* seedlings of 4 days after germination (DAG) were transferred to fresh agar plates with 0.2 × MS media inoculated with an aliquot of 10 μL ( $1 \times 10^5$  cfu/mL) from an overnight culture of *B. velezensis* 83 or *B. velezensis* FZB42 (Fan et al. 2018). Six seedlings in each plate were carefully placed over the bacterial stria and whose shoots were approximately 1 cm from the bacterial inoculum. For Col-0 seedlings, the plates were incubated for an additional 6-day period and the root and primary root length, lateral root length (of the longest lateral root in each seedling) and shoot diameter were measured with a ruler, while lateral roots in the primary root and leaves in the shoot were recorded using a stereomicroscope Olympus SZ40 (Olympus Iberia S.A.U, Barcelona, España) at a 10X magnification. Lateral root density was calculated dividing lateral root number between the primary root length, and those parameters were obtained of 18 individuals for each treatment. Plant biomass, total fresh weight, shoot fresh weight and root fresh weight of 6 seedlings grown on the same plate were measured with an analytical balance Ohaus PA224 (Ohaus Corporation, Newjersey, USA), and three plates of each treatment were evaluated.

### Secondary metabolites production

For secondary metabolites production, *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 were grown in liquid batch cultures using a mineral medium with the following composition (in g/L): glucose 30.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.98; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9.6; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.4; CaCl<sub>2</sub> 0.1; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.08; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.019. The batch cultures of each strain were carried out inoculating 5 mL of an overnight culture in YPG medium ( $2 \times 10^9$  cfu/mL) in 500 mL shaken flasks with 100 mL of working volume and incubated at 30 °C and 200 rpm for 48 h. Cultures were conducted at initial pH of 6.8 adjusted with NaOH before



sterilization. *B. velezensis* FZB42 liquid batch culture was carried out under the same experimental conditions. Cell concentration (cell/mL) was determined using a Neubauer chamber.

#### **Glucose, acetoin and 2,3-butanediol concentrations**

A 1 mL sample was collected from the shaken flask and bacterial cells were removed from the medium by centrifugation (10,000 × *g*, 15 min) and filtration through a 0.2 μm membrane (hydrophilic and nonpyrogenic, Sartorius AG, Goettingen, Germany). Glucose, acetoin and butanediol in the supernatant were analyzed by high resolution reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC) using methodology reported previously (Cristiano-Fajardo et al. 2019) with minor modifications. Briefly, 20 μl of the sample was loaded to an Aminex HPX-87H column (7.8 × 300 mm; Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) and separated by using a Waters 2695 HPLC system (Waters Corporation, Massachusetts, USA). Acetoin was determined by absorbance at 210 nm and glucose and butanediol by refraction index. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM was used as mobile phase with a flow of 0.6 mL/min. Column temperature was adjusted at 50 °C. Pure glucose, acetoin and butanediol (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) were used as standards.

#### **Surfactin and bacillomycin concentration**

A 1 mL sample was collected from the shaken flasks and bacterial cells were removed from the medium as described above. The supernatant was loaded to a ZorbaxSB-C18 column (4.6 mm × 150 mm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and separated by HPLC by using a Waters 2695 HPLC system. The mobile phase was composed by 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (phase A), and 0.1% TFA in acetonitrile (phase B). Samples were eluted for 14 min using 40% of phase B at 32 °C with a flow rate of 0.3 mL/min, followed with a linear gradient of 40–85% for 1 min and maintained at 85% for another 36 min; finally a new linear gradient of 85–40% for 1 min, continued at 40% for 8 min. The elution pattern was monitored by determining absorbance at 205 nm. Pure surfactin and iturin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) were used as standards.

#### **Poly-γ-glutamic acid concentration and mean molecular weight**

Concentration of γ-PGA and mean molecular weight (MW) in the supernatant was determined by gel permeation chromatography (GPC) using methodology reported previously (Cristiano-Fajardo et al. 2019). Summarizing, 100 μl of cell-free supernatant was loaded into serial connected Ultrahydrogel columns (UG500/Linear; Waters Corporation, Massachusetts, USA), using a Waters 2695

HPLC system. γ-PGA was eluted with 0.1 M NaNO<sub>3</sub> using a flow rate of 0.8 mL/min, columns temperature was adjusted at 38 °C. γ-PGA was detected with a refractive index detector (Waters 2414, USA). Pure γ-PGA (Sigma-Aldrich Inc., Missouri, USA) solutions were used as standards for polymer concentration calculation and poly(ethylene oxide) (Waters Corporation, Massachusetts, USA) with MWs in the range of 24–933 kDa were used as standards for mean MW.

#### **Genome sequencing, assembly and annotation**

Genomic DNA from *B. velezensis* 83 was sent to MOgene Genome Sequencing Services (Mogene LC; St. Louis, MO, USA) with the following requests: libraries of 350 bp fragment size and paired end sequencing (2 × 250 bp) in MiSeq sequencer. The total number of reads was about ~7,000,000 paired reads that represents a genome coverage ~400X. Genome assembly was performed as described previously in Pérez-Carrascal et al. (2016). Briefly, a combined de novo and reference-based assembly was obtained with the Spades Genome Assembler (SPAdes; Bankevich et al. 2012). First, the SPAdes contigs were aligned, using NUCmer (Kurtz et al. 2004), to the complete genome of *B. velezensis* YAU-B9601-Y2 the closest phylogenetic relative to *B. velezensis* 83 (Hao et al. 2012). Second, the Illumina reads were mapped onto the contigs assembly, oriented according the 5'-3' directions of their pair-ends, and joined manually with Consed (Gordon et al. 2013). At the end, we obtained a single contig representing a closed circular chromosome 3,997,902 bp length. The protein-coding regions (ORFs, open reading frames) were predicted with Glimmer 3.02 (Delcher et al. 2007). The ORFs model was uploaded into Artemis 12.0 (Carver et al. 2012) to make ORFs frame rectifications and register manual annotations. Functional descriptions of genes were obtained by BlastX searches of the complete set of ORFs against the non-redundant database of the GenBank (Benson et al. 2008). A best-blast hits table was created with the parameters of the percentage of identity and similarity, coverage of the ORFs, coordinates of the matches, and the annotated function of the protein. Additional comparisons with the Conserved Domain Database (CDD) of the GenBank (Marchler-Bauer et al. 2015), Interpro (Mitchell et al. 2015), and IS-database (Siguier et al. 2006), contributed to confirm the GenBank-based annotations and to solve controversial cases. COG annotation was done using the NCBI COGs database (Tatusov et al. 2000) with BlastP comparisons (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) with the minimal similarity of 30% and e-value < 1 × 10<sup>-6</sup>. The whole genome sequence of *B. velezensis* 83 was deposited in GenBank under the accession number CP034203.

### Genome analysis

Genome analysis was performed following the standard methodology described in González et al. (2019). In short, the pangenome model was obtained with the Bacterial Pangenome Analysis program (BPGA), by setting the USEARCH clustering algorithm to the default values (the minimal identity of 50% and 20 combinations) (Chaudhari et al. 2016). The phylogenetic tree was done in MEGA-6 evolutionary analysis software (Tamura et al. 2013) by Maximum Likelihood (ML) method using the JTT matrix (Jones et al. 1992) and bootstrap of 1000 replicates.

The accessory genome obtained with BPGA, was represented in a heatmap of presence and absence of genes and schematized with heatmap.2 (R's gplots package; <https://rdrr.io/cran/gplots>). Genome comparisons were illustrated by circular maps obtained with GenVision of DNASTAR (Lasergene Core Suite (<https://www.snapgene.com>)). Whole-genome comparisons were performed with selected *Bacillus* strains using Average Nucleotide Identity (ANI) calculated with JSpecies (Richter et al. 2016), and MUMmer 3.06 (Kurtz et al. 2004). Prophage searches were done with the Phaster program (Arndt et al. 2016).

### Statistical analysis

All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey comparison procedure assuming equal variances using Minitab™ 17 Statistical Software (Minitab, LLC, Pennsylvania, USA).

## Results

### *B. velezensis* 83 is a biological control agent and plant growth-promoting bacteria

Mango anthracnose severity was reduced in trees treated with *B. velezensis* 83 at three different doses, and fruit damage was similarly to those fruits harvested from trees with chemical conventional treatments (Captan 50 PH™ or Cupravit hydro™). The highest anthracnose severity in Kent mango fruits was found in the control treatment (Table 1). In maize, the application of *B. velezensis* 83 to the root caused an increase of 12% in height (Fig. 1a) of the seedlings, however, it has no effect on their shoot biomass (Fig. 1b) but an increase of 45% of the root biomass (Fig. 1c) of the seedlings was observed with respect to the uninoculated control. When the treatment was applied to seeds, the growth-promotion capacity of *B. velezensis* 83 was also evident. With respect to the control, the application of *B. velezensis* 83 caused an increase of 38% of the height and 88% of the shoot biomass, even if no effect on the root biomass was observed.

**Table 1** Severity and biocontrol efficacy of *B. velezensis* 83 in mango ocharchs

Treatment	Severity	Efficacy (%)
Fungifree AB™ (1 g/L)	4.8a	65.9
Fungifree AB™ (2 g/L)	2.4a	82.9
Fungifree AB™ (3 g/L)	2.8a	80.5
Captan 50 PH™	2.1a	85.4
Cupravit Hidro™	2.4a	82.9
Control	14.2b	0

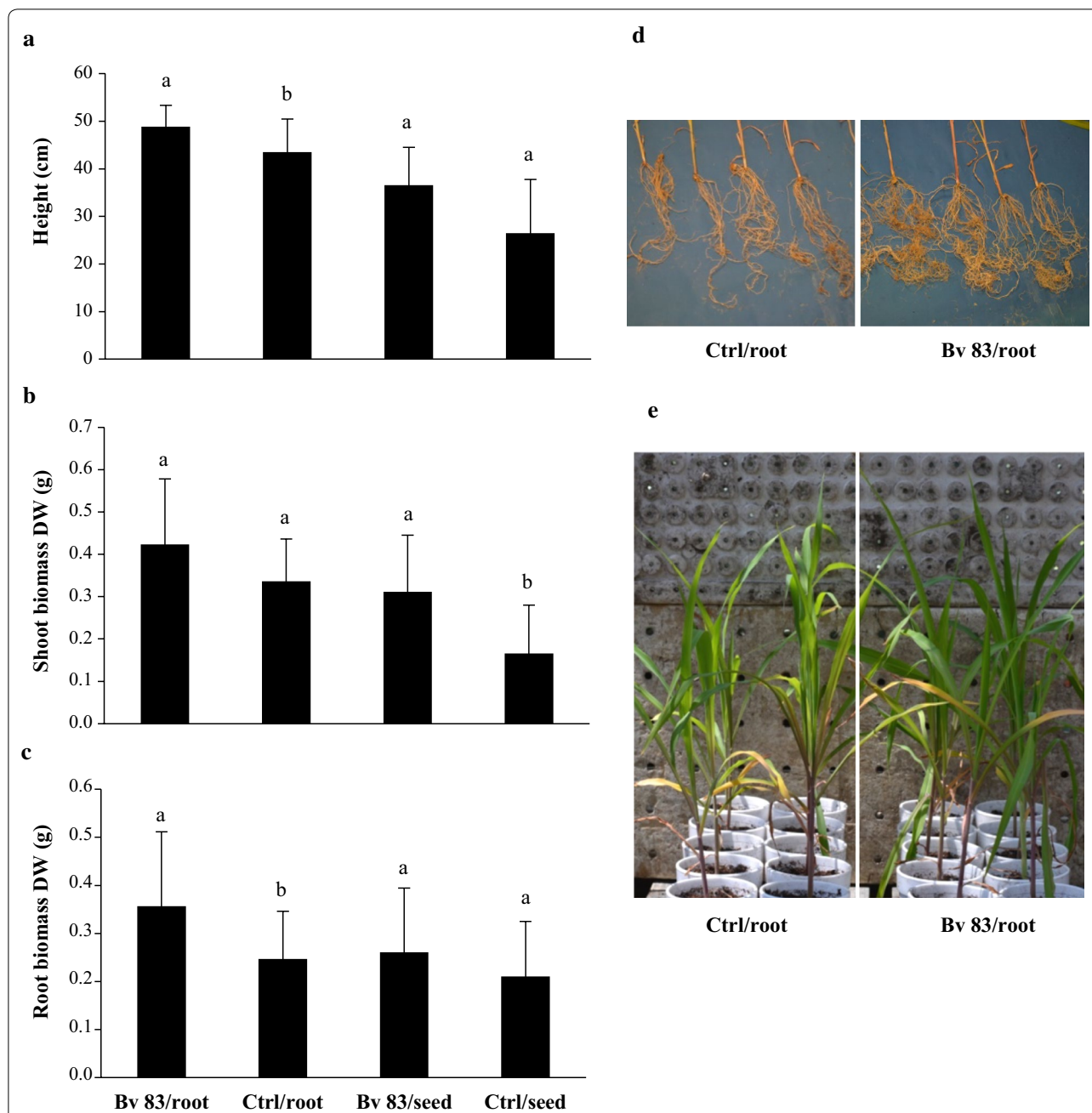
Different letters indicate significant differences among the treatments at  $P \leq 0.05$

### Genomic and pangenomic features of *B. velezensis* 83

The complete genome of *B. velezensis* 83 consists of 3,997,902 bp with an average G + C content of 46%, 7 copies of the rRNAs operon (16S, 23S and 5S RNA) and 68 tRNA genes. The genome was predicted to encode 3752 coding sequences (CDS) of which 3255 were functionally annotated, whereas 497 were hypothetical. A total of 2892 CDS were assigned to COGs (cluster of orthologous groups). Functional classes defined by COGs indicate that *B. velezensis* 83 harbor a high proportion of proteins involved in carbohydrate (COG G) and amino acids transport and metabolism (COG E), as well as in transcription (COG K). The pangenome model of 27 selected strains of *B. velezensis* (including *B. velezensis* 83) and *B. amyloliquefaciens* strains approaches an asymptote (Additional file 1. Fig. S1) indicating, as in other *Bacillus* species, that *B. velezensis* has a closed pangenome structure and limited variation in gene content. The pangenome size consist of 5263 gene families, of which 2683 belong to the core genome, 1928 gene families in the accessory component, and a total of 652 unique gene families unevenly distributed in the 27 *B. velezensis* strains. Particularly, only 12 genes were unique in *B. velezensis* 83, most of them were hypothetical. The accessory genome described by a heatmap of presence/absence of genes indicates that although *B. velezensis* belongs to a clade with very related strains, each one still has some genetic differences that make each strain unique (Fig. 2).

### Taxonomic affiliation of strain 83

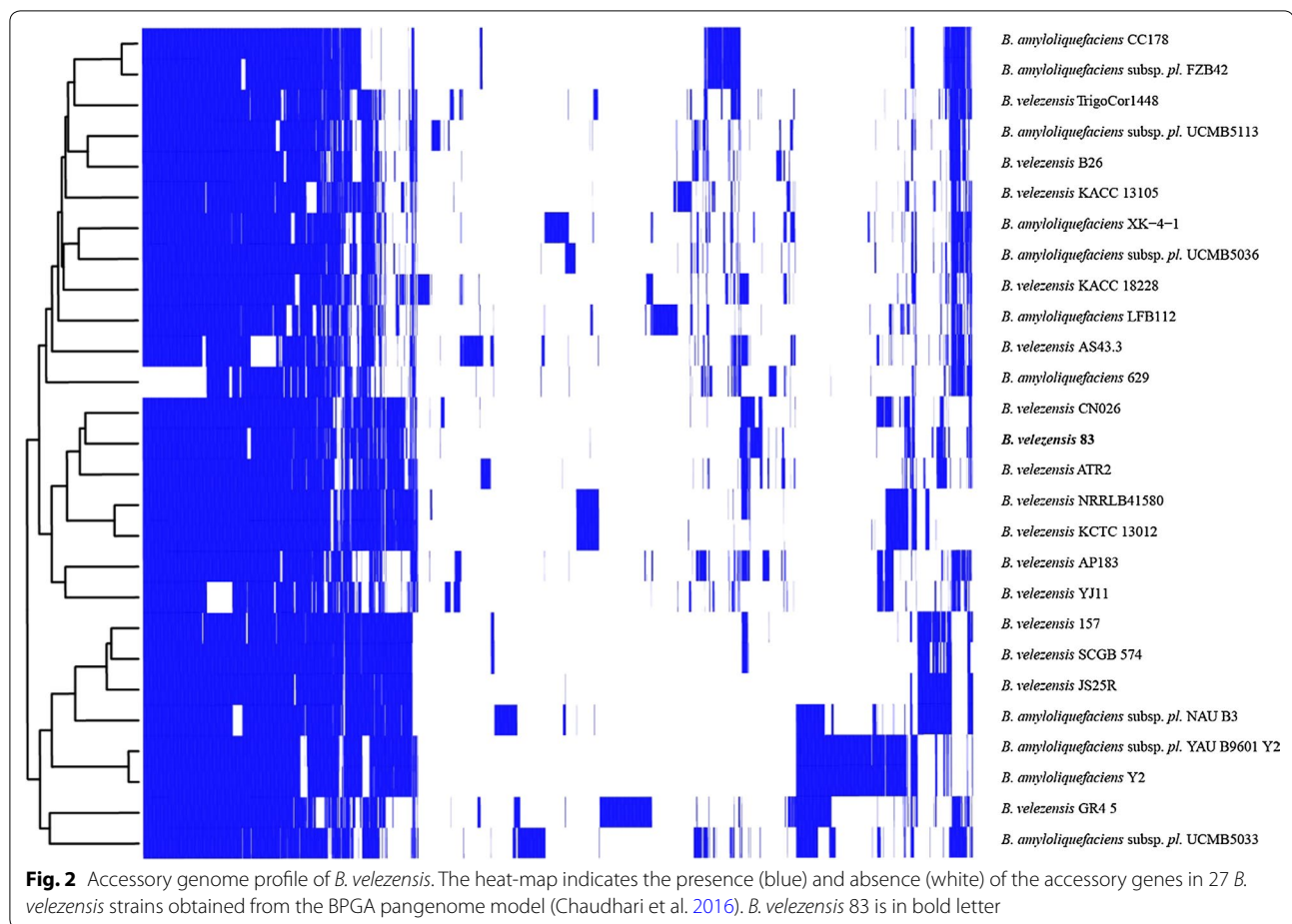
Based on phylogenetic analysis of the 16S ribosomal genes, *Bacillus* strain 83 was initially classified as *Bacillus subtilis* (Galindo et al. 2013). To review this classification in the light of genome sequence presented here, we performed pairwise whole-genome comparisons between this strain and other *Bacillus* species using the Average Nucleotide Identity (ANI) (Richter et al. 2016). The results indicate that *B. subtilis* 83 is closely related to *B. velezensis* (ANIm > 97%, Additional file 1. Fig. S2). To support this observation, we did a phylogenomic analysis



**Fig. 1** Growth-promoting effect of *B. velezensis* 83 on maize seedlings. **a** Height (cm) of the seedlings, **b** Shoot biomass (g) dry weight (DW) of the seedlings, **c** Root biomass (g) dry weight (DW) of the seedlings. Bv 83/root: Fungifree AB™ treatment to the root, Ctrl/root: without treatment to the root, Bv 83/seed: Fungifree AB™ treatment to the seed, Ctrl/seed: without treatment to the seed. **d** Aspect of the root of seedlings of Ctrl/root and Bv 83/root treatment. **e** Aspect of the shoot of seedlings of Ctrl/root and Bv 83/root treatment. N = 15. Different letters indicate statistically significant differences among treatments at  $P \leq 0.05$

using 20 core housekeeping genes determined from the pangenome analysis of 27 *B. velezensis* strains (including strain 83). The phylogenetic tree, located the *B. subtilis* 83 together strains of *B. velezensis*, *Bacillus methylotrophicus*, and *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, into a

very related clade forming the recently recognized species called *B. velezensis* (Fig. 3) (Dunlap et al. 2015; Fan et al. 2017). Although *B. velezensis* and *B. amyloliquefaciens* are known plant growth-promoting bacteria, strains of the former are commonly associated with plants while



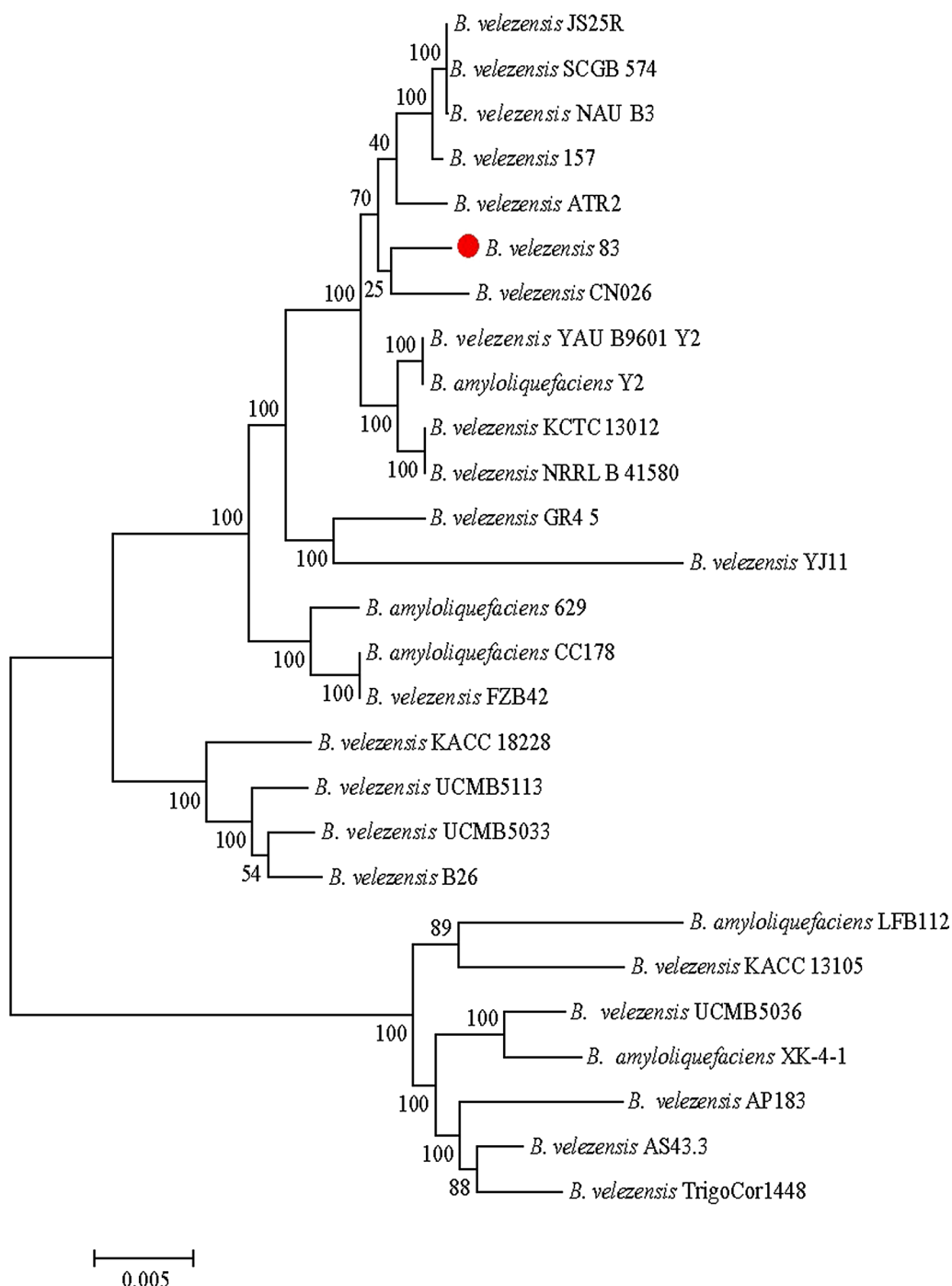
the latter is constituted by soil-borne strains (Fan et al. 2017). These results support place *B. subtilis* strain 83 within *B. velezensis* species and allow us to correct its previous wrong classification.

#### Genes related to biological control and sporulation

Genomic comparisons of *B. velezensis* 83 with the strains *B. velezensis* FZB42, *B. velezensis* YAUB601-Y2, *B. amyloliquefaciens* DMS7 and *B. subtilis* 168, showed high conservation and collinearity in the chromosomal sequence (Fig. 4). The genome of *B. velezensis* 83 harbors ten gene clusters dedicated to the synthesis of biocontrol metabolites (Table 2) with high genomic homology with *B. velezensis* FZB42 (Additional file 1. Table S1), covering about 8.2% of its genome. The genome of *B. velezensis* 83 contains five Non-Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS) and three Polyketide Synthases (PKS) gene clusters. The *sfp* gene coding for the 4'-phosphopantetheinyl transferase responsible for the conversion of the apo-ACP domains of PKS and NRPS to their active holo-forms, was also identified in this strain together with the regulatory gene *yczE*. The predicted products

of these NRPS gene clusters are the lipopeptides surfactin (*srfA*), bacillomycin (*bmy*) and fengycin (*fen*), the siderophore bacillibactin (*dhb*) and the dipeptide bacilysin (*bac*). In the PKS gene cluster, the genes encoding for macrolactin (*mln*), bacillaene (*bae*) and difficidin (*dfn*) were identified. In addition, a gene cluster probably involved in the production of the lantibiotic amylocyclin, and the *pur* gene cluster for synthesis of a nematicide compound were located (Xia et al. 2011). However, *B. velezensis* 83 showed some incomplete gene clusters. For instance, the cluster for subtilin (*spa*) synthesis presents only five genes (*spaEFGRK*) out of ten reported; lacking those genes involved in the synthesis and transport of subtilin (Stein et al. 2002). The gene cluster for mersacidin (*mrs*) synthesis was also partially present, as only five genes (*mrsK2*, *mrsR2*, *mrsFGE*) out of ten reported were found; the genes for synthesis, modification and export of mersacidin are absent, keeping only those for regulation and immunity for this antibiotic (Schmitz et al. 2006). The results indicate that *B. velezensis* 83 may produce a wide repertoire of metabolites with biocontrol properties. The sporulation capacity of *Bacillus* has been

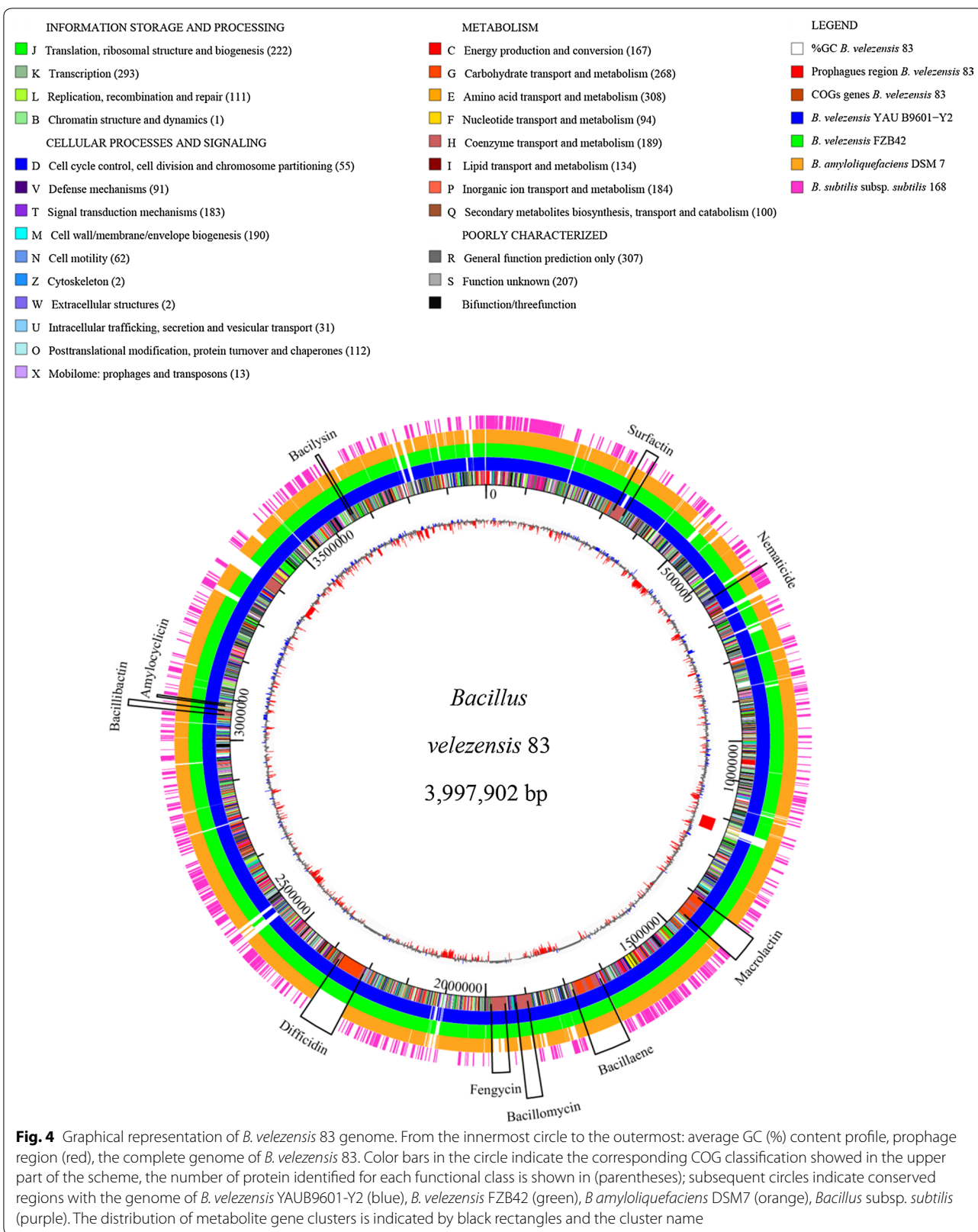




**Fig. 3** Taxonomic affiliation of *B. velezensis* 83. The phylogenomic tree was performed with 20 concatenated genes of the core families determined with BPGA (Chaudhari et al. 2016; see methods). *Bacillus* strains were selected from the phylogenomic neighbor joining tree reported in Dunlap et al. (2015). The tree is the result of 1000 replicates using the maximum likelihood method (ML) in MEGA program (Tamura et al. 2013). Red dot indicates the position of *B. velezensis* 83

exploited by the biopesticide industry to the preparation of powder formulations because spores are easier to handle and store, presenting a longer shelf life compared

to liquid preparations. The sporulation process of *Bacillus* strains is carried out through the Spo0A pathway (Romero 2013; Liaqat et al. 2013; Yan et al. 2016) and the



**Fig. 4** Graphical representation of *B. velezensis* 83 genome. From the innermost circle to the outermost: average GC (%) content profile, prophage region (red), the complete genome of *B. velezensis* 83. Color bars in the circle indicate the corresponding COG classification showed in the upper part of the scheme, the number of protein identified for each functional class is shown in (parentheses); subsequent circles indicate conserved regions with the genome of *B. velezensis* YAU B9601–Y2 (blue), *B. velezensis* FZB42 (green), *B. amyloliquefaciens* DSM7 (orange), *Bacillus* subsp. *subtilis* (purple). The distribution of metabolite gene clusters is indicated by black rectangles and the cluster name

**Table 2 Genes involved in synthesis of biocontrol metabolites in *B. velezensis* 83**

Metabolite	Gene cluster	Size (kb)	Position
Surfactin	<i>srfAABCD</i>	26.1	320,917–347,075
Macrolactin	<i>mInABCDEFGH</i>	53.2	1,404,749–1,458,017
Bacillaene	<i>baeBCDE,acpK,bacGHIJLMNRS</i>	71.7	1,714,735–1,787,205
Bacillomycin	<i>bmyCBAD</i>	36.9	1,890,815–1,928,064
Fengycin	<i>fenEDCBA</i>	37.6	1,950,976–1,988,645
Difficidin	<i>dfnMLKJIHGFEDCBXYA</i>	69.1	2,308,397–2,377,919
Amylocyclin	<i>acnFEDCAB</i>	4.0	3,085,092–3,089,264
Bacillibactin	<i>dhbFBECA</i>	11.7	3,061,830–3,073,566
Bacilysin	<i>bacEDCBA</i>	4.7	3,661,180–3,665,866
Nematicide	<i>pur(EKBCSQLFMNHD)</i>	12.7	638,387–651,184

lack of some genes for the signaling cascade can affect the sporulation process (Branda et al. 2001; Yan et al. 2016). As predictable, in the genome of *B. velezensis* 83, all the genes involved in the different stages of the sporulation process (Additional file 1. Table S2), described by other authors (Romero 2013; López and Kolter 2010; Tan and Ramamurthi 2013) were found. Ten genes coding for Rap (response regulator aspartate phosphatase) proteins (Rap A1,-A2,-B,-C,-D,-E,-F,-H,-J,-K1 and -K2) and three genes coding for Phr peptides (PhrA,-C-K) were identified. The interaction between Rap protein-Phr peptide results in a regulatory system which function is being the communication bridge between sporulation and competence process in *B. subtilis* (Schultz et al. 2009), the competence is a physiological state through the cell uptakes of exogenous DNA through which genomic diversity and evolution is generated (Brito et al. 2018).

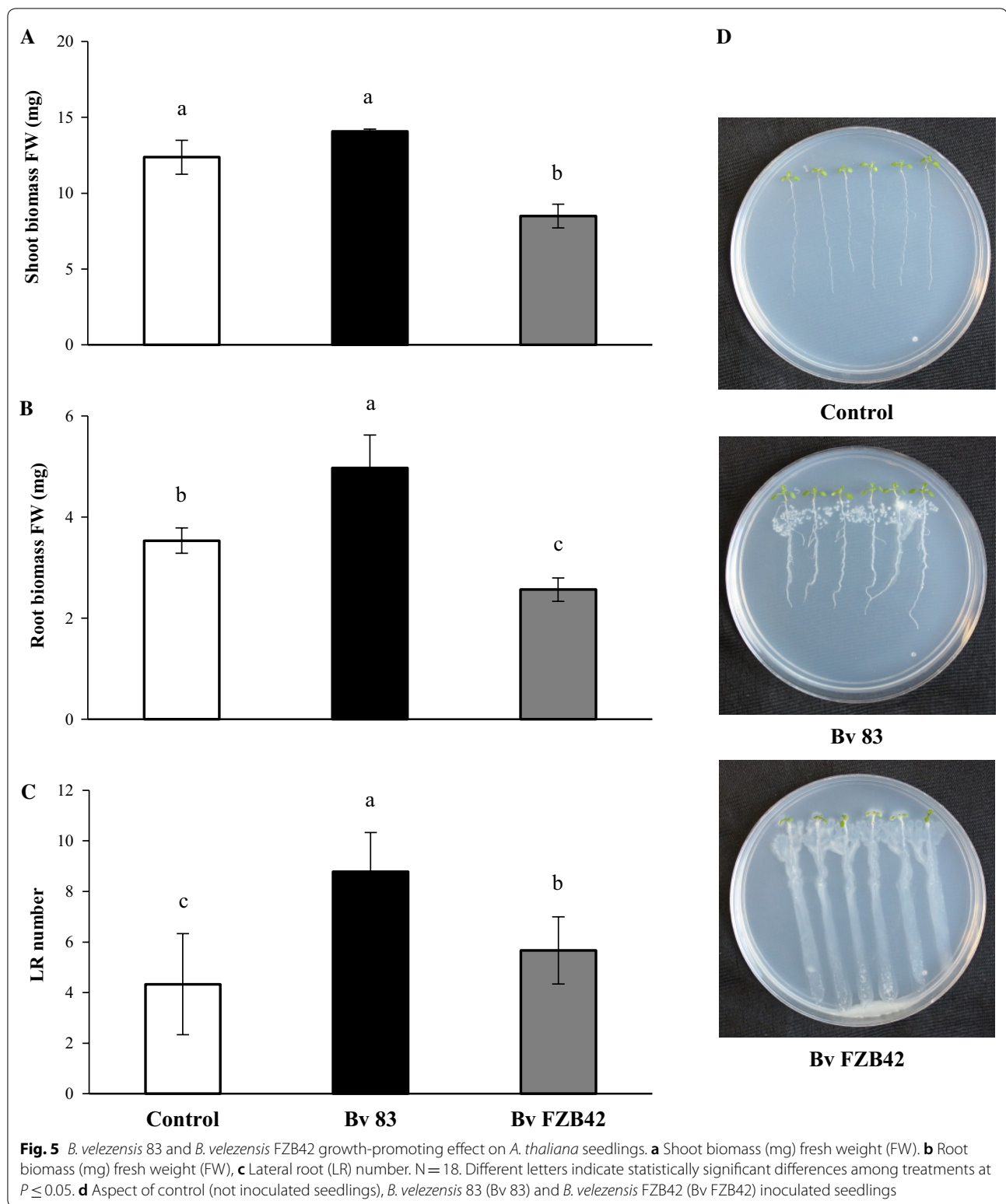
#### Genes related to plant-bacteria interaction

*B. velezensis* 83 genome harbors genes involved in different process of plant-bacteria interaction (Additional file 1. Table S3). For biofilm formation, the operon for exopolysaccharide (*epsA-O*) synthesis and the operon *yqxM-sipW-tasA* for TasA protein fibers synthesis, are present (Al-Ali et al. 2018). Besides, genes coding for other biofilm components (Marvasi et al. 2010), such as the  $\gamma$ -polyglutamic acid polymer (*pgdS*, *pgsEACB*), the levansucrase (*sacB*) enzyme, and the proteases bacillopeptidase F (*bpr*), glutamyl endopeptidase protein (*mpr*), epr subtilisin family serine protease protein (*epr*), bacillolysin (*npr*) and the extracellular serine protease protein (*vpr*), were all found. Several genes exclusively present in *Bacillus* strains associated to plants were also found in *B. velezensis* 83 genome. That genes are involved in carbohydrate metabolism and plant cell wall degradation as described by Borriss et al. (2011), like amylase E

(*amyE*), cellulase (*bglC*), xylanase (*xynACD*), galactokinase (*gal1*), and betaglucanase (*bglCS*). To assess the potential of *B. velezensis* 83 as plant growth-promoting bacteria, we also looked for genes already reported to promote the plant growth (Belbahri et al. 2017). Three different pathways described (Idris et al. 2007) for synthesis of the auxin indole acetic acid (IAA) were found: 1) the one of indole-3-pyruvate (IPyA) dependent of tryptophan transaminase gene clustering (*patB*, *YclC*, *YclB*, *DhaS*) products, 2) that of indole-3-acetonitrile (IAN) in which the nitrilase gene (*yhcX*) product acts, and 3) an uncharacterized IAA biosynthesis pathway in which the product of the gene acetyltransferase (*ysnE*) participates. The gene coding the protein involved in auxin excretion (*ywkB*) was also found. In addition, the cluster (*alsDSR*) encoding a  $\alpha$ -acetolactate synthase for the synthesis of acetoin and 2,3-butanediol was present. Interestingly, even though *B. velezensis* 83 was isolated from mango tree phyllosphere, the strain has all the necessary genes to establish a rhizosphere plant-bacteria interaction. Therefore, in addition to control foliar phytopathogens, *B. velezensis* 83 seems to have the potential to be a biological control agent for root phytopathogens, probably eliciting ISR and/or promoting root growth.

*Phenotypic differences between B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42.

*B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 (reference strain) had >98% of identity (Additional file 1. Fig. S2). Through an in vitro co-culture assay with *A. thaliana* we showed the plant growth promotion effect of *B. velezensis* 83, it was compared with that caused by *B. velezensis* FZB42 and also both strains were compared against a control (uninoculated seedlings) (Fig. 5). After two days, *B. velezensis* 83 promoted the growth of *A. thaliana*, in contrast to the inoculation with *B. velezensis* FZB42, which had a suppressive effect over plant growth. There were no significant effects in terms of shoot biomass of *A. thaliana* caused by *B. velezensis* 83 inoculation (Fig. 5a); however, the main effect was observed in the root biomass (Fig. 5b). *B. velezensis* 83 increased significantly the lateral root number (102% more than the control) (Fig. 5c). This was similar to data reported for other *Bacillus* strains (Ryu et al. 2004, 2005; López-Bucio et al. 2007; Niazi et al. 2014; Asari et al. 2016, 2017; Verbon and Liberman, 2016; Islam et al. 2016; Kuan et al. 2016). Surprisingly, seedlings inoculated with *B. velezensis* FZB42 had only 69% and 73% shoot and root biomass (FW), respectively, as compared with the control. Furthermore, there were significant differences in other parameters of plant growth caused by both strains in *A. thaliana*: the primary root length, root density, lateral root length, shoot number, shoot diameter and total biomass were increased when using *B. velezensis* 83 but



decreased when using *B. velezensis* FZB42 (Additional file 1. Fig. S3). Something characteristic of the inoculation of each strain was the bacterial pattern of seedling

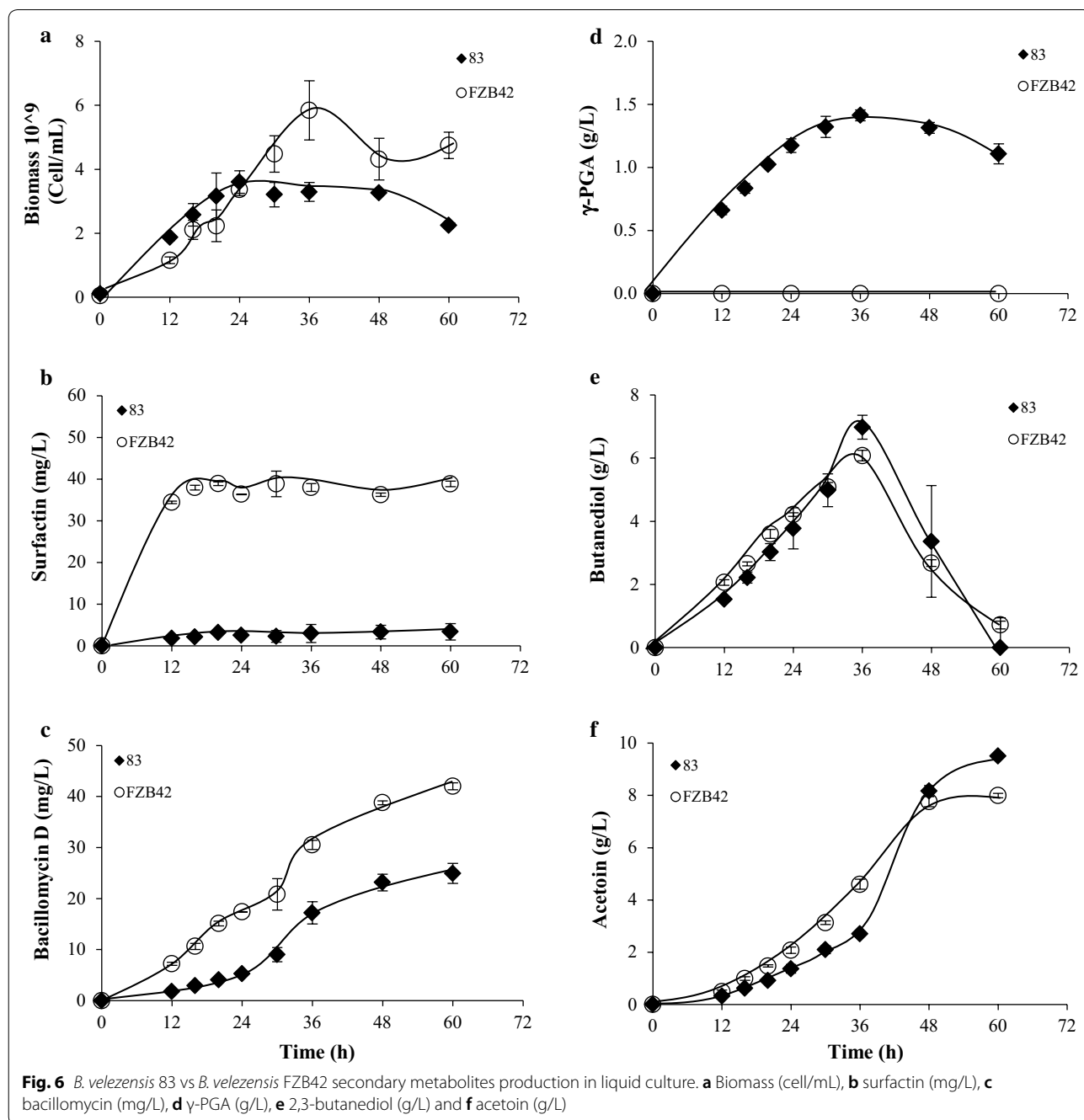
colonization. It was observed that *B. velezensis* 83 colonized forming a well defined and robust biofilm following the contour and development of the roots of each



seedling, while *B. velezensis* FZB42 had an exacerbated growth and colonized extending its biofilm beyond the root and also invading the seedling shoot (Fig. 5d).

To test the functionality of some *B. velezensis* 83 gene clusters coding for synthesis of secondary metabolites related with biological control and plant interaction, several in vitro experiments were carried out (Fig. 6). With the culture conditions used in this study, *B. velezensis* 83 reached a maximum biomass of  $3.3 \times 10^9$  cell/mL

(Fig. 6a), the stationary growth phase started after glucose and acetate were depleted in the medium (Additional file 1. Fig. S4). Surfactin and bacillomycin production was detected since 12 h of culture. *B. velezensis* 83 produced up to 3.4 mg/L of surfactin (Fig. 6b) and 23.2 mg/L of bacillomycin (Fig. 6c). The  $\gamma$ -PGA was produced between the 12<sup>th</sup> and 36<sup>th</sup> h of cultivation, the maximum  $\gamma$ -PGA concentration was 1.4 g/L (Fig. 6d) and it was associated with the increase of apparent viscosity (3.9–4.9 cp) in the



media. The  $\gamma$ -PGA MW was 1.8–2.0 MDa, but this compound was consumed after glucose depletion in the culture media (Additional file 1. Fig. S4). The production of 2,3-butanediol and acetoin were associated with biomass growth and glucose metabolism; nevertheless, 2,3-butanediol was consumed when glucose was depleted in the media. The maximum 2,3-butanediol concentration was 6.97 g/L (Fig. 6e) and acetoin was 9.51 g/L (Fig. 6f). On the other hand, the strain *B. velezensis* FZB42 showed a similar behavior in glucose consumption, as well as acetate, 2,3-butanediol and acetoin production. Nevertheless, the main differences observed between *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 strains were the maximum growth,  $\gamma$ -PGA as well as lipopeptides production. With the culture conditions used in this work, *B. velezensis* FZB42 did not produce  $\gamma$ -PGA but instead produced more biomass ( $5.8 \times 10^9$  cell/mL), and more surfactin (34.5–39 mg/L since 12 h of culture time) and bacillomycin, than *B. velezensis* 83. We know that the gene cluster (*pgdS*, *pgsEACB*) involved in the synthesis  $\gamma$ -PGA are present in both strains *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 and they are of high identity (98%). Nevertheless, it is known that *B. velezensis* 83 is a glutamic acid independent  $\gamma$ -PGA producing strain (Cristiano-Fajardo et al. 2019) as other few *Bacillus* strains (*B. subtilis* C10, *Bacillus licheniformis* A13, *B. licheniformis* TISTR 1010, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis* NX2, *B. amyloliquefaciens* LL3) which only need glucose and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as carbon and nitrogen sources, respectively, for  $\gamma$ -PGA synthesis (Cao et al. 2011; Hsueh et al. 2017; Sha et al. 2019). In contrast, lack of  $\gamma$ -PGA production by *B. velezensis* FZB42 could be explained due to a glutamate dependent mechanism. Therefore, *B. velezensis* 83 in addition to being a biological control agent and plant growth-promoting bacteria, is a new *B. velezensis* reported in the list of glutamate-independent  $\gamma$ -PGA producer strains reported recently (Sirisansaneeyakul et al. 2017).

A BlastP analysis (70% coverage with 50% identity) between *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 genomes shown that these two strains share 3475 core genes. In *B. velezensis* 83 genome there were 371 unique genes, 57% of them were genes with known function, 40% hypothetical proteins, 3% phage sequences and 1% kinase genes, while in *B. velezensis* FZB42 genome there were 262 unique genes. In *B. velezensis* 83 the *cysTWA* gene cluster (sulfate permease) and the *sbp* gene (sulfate ABC transporter substrate-binding protein) were found, these genes provide the ability to assimilating sulfite as well as thiosulfate to bacteria as sulfur sources (Guédon and Martin-Verstraete, 2006). Furthermore, *cysTWA*, *sbp* and *cysP* (thiosulfate transporter) genes complete the synthesis pathway of amino acid cysteine which has only been reported for the *B. subtilis* BD170 strain and

other bacteria such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (Mansilla and de Mendoza, 1997). Cysteine is an amino acid present in antimicrobial peptides of ribosomal synthesis as bacteriocins (Abriouel et al. 2011) and other peptides as subtilisin (Graycar et al. 2013), surprisingly subtilin and mersacidin gene cluster were incomplete and only three genes for subtilisin (serine proteases: *apr*, *aprx* and *epr*) were found in *B. velezensis* 83 genome. Some *Bacillus* spp. strains also produce sulfur containing VOC such as carbon disulfide, dimethyltrisulfide and thiophene, which has been reported with antifungal activity (Caulier et al. 2019). Other relevant genes such as quorum-sensing (QS) pheromone *comX*, *rap* proteins (*rapK1*, *rapK2* and *rapH*) and *phrK* peptide were identified as unique genes. In *B. subtilis* group ComX pheromone determines the phenotype and that the social communication cell–cell to establish community structures within and between biofilms (Kalamara et al. 2018). ComX is the first signal to activate the transcription factor ComA which regulates the expression of several genes involved in the sporulation-competence signal transduction network (Schultz et al. 2009) as well as the production of surfactin, exoproteases and extracellular matrix for biofilm formation (Kalamara et al. 2018). ComX also could be different for strains of the same specie as reported for *Bacillus* spp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants, which also showed different growth promotion effect over the plants (Oslizlo et al. 2015). There are two groups of Rap proteins, those that show phosphatase activity (RapA, RapB, RapE, RapH and RapJ) over effector response regulators (RR) and those that exert their function blocking the DNA-binding activity (RapC, RapF, RapG, RapH, and RapK) of their RR target, each Rap protein is specifically inhibited by a Phr peptide (Gallego del Sol and Marina, 2013). RapH protein negatively regulates *srfA* expression in *B. velezensis* MT45 and *B. velezensis* DSM7 (Zhi et al. 2017) and RapK-PhrK regulates the expression of several genes known to be activated directly by ComA (competence-sporulation genes) and indirectly by Spo0A (sporulation-biofilm genes) (Auchtung et al. 2006).

## Discussion

*B. velezensis* 83 is an efficient biocontrol agent of mango anthracnose and plant growth-promoting bacteria of maize. México is one of the biggest worldwide mango exporters, for this reason Mexican mango orchards are worked carefully to obtain fruit with phytosanitary quality for its competitiveness in the international market. This means that mangoes pests (like fruit fly) and diseases (like anthracnose) must be absent at the harvest day as well as during the time of storage previous to its commercialization at the final export destination (21 days

for boat transport from México to Japan). When chemical products are used for the control of anthracnose, it is important to ensure that the maximum residue limits (MRLs) of pesticides are under the maximal concentration allowed by international standard. Therefore, the relevance of biological control with *B. velezensis* 83 lies in the fact that it is an innocuous product for human consumption, whose application is efficient for the control of anthracnose in mango Kent (between 65 and 80%) such as treatments with agrochemicals (Captan 50 PH<sup>TM</sup> or Cupravit hydro<sup>TM</sup>). *B. velezensis* 83 produces, in vitro, bacillomycin D, a lipopeptide that inhibits both spore germination and mycelial growth, propidium iodide staining of spores and mycelium showed that bacillomycin D caused damage to the cell membranes of *C. gloeosporioides*, affecting directly its viability (Luna-Bulbarela et al. 2018). Interestingly, *B. velezensis* 83 genome harbors three gene clusters coding synthases dedicated to the production of antifungal compounds, including the lipopeptide fengycin, the siderophore bacillibactin and the dipeptide bacilysin, which could contribute to its ability for the biocontrol of mango trees anthracnose. Other *Bacillus* strains have similar antimicrobial compounds production and biocontrol capacity. For example, a 70% of control for crown rot causing pathogens (*Lasiodiplodia theobromae*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* and *Fusarium verticillioides*) was obtained in postharvest banana fruits inoculated with *B. amyloliquefaciens* DGA14 ( $10^8$  cfu/mL) (Alvindhia, 2013). *B. amyloliquefaciens* GYL4 ( $10^4$ – $10^8$  cfu/mL) displayed between 46–93% of control efficacy on anthracnose of cucumber (Kim et al. 2016), *B. velezensis* RC 218 ( $10^4$ – $10^6$  cfu/mL) (Palazzini et al. 2016) and *B. velezensis* TrigoCor1448 ( $>10^8$  cfu/mL) (Crane et al. 2013) were able to control the *Fusarium* head blight in wheat.

*B. velezensis* 83 as plant growth-promoting bacteria had a different effect on the growth of the maize seedlings development depending on the phenological state of the maize, application to root seedling promoted the root development, in contrast application in seed state promoted the shoot development. Traits as phosphate solubilization, auxin and VOC (as 2,3-butanediol and acetoin) production by *B. velezensis* 83 could be involved in the growth promotion of maize as has been reported for other strains (Bentes et al. 2019; Cui et al. 2019). Plant hormone homeostasis is affected by PGPR production of auxins, ethylene, gibberellins, abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, and different effects are observed on shoot or root system, being auxin the main hormone which regulates the plant growth and development (Tsukanova et al. 2017). PGPR production of auxins promotes plant-PGPR interaction, activates jasmonic acid dependent plant resistance, affects the expression of genes involved

in auxin synthesis and transport (influx and efflux carriers), the PGPR colonization site affect the auxin gradient in the plant and also the bacterial VOC affect the auxin genes expression (Tsukanova et al. 2017). However, it has been reported that auxin has a complex crosstalk network (involving gene expression, signal transduction, and metabolic conversion process) with cytokinin and ethylene to coordinate the root development in *A. thaliana* (Liu et al. 2017a, b), thus the PGPR could affects several physiological processes in the plant at the same time.

In order to show the plant growth promotion effect, *B. velezensis* 83 was used in the in vitro assays with the model plant *A. thaliana* using  $10^5$  cfu/mL for in vitro inoculation, because a higher concentration of *B. velezensis* 83 cells ( $>10^7$  cfu/mL) had a growth suppressive effect on *A. thaliana* (data not shown). On the other hand, *B. velezensis* FZB42 in  $10^3$  cfu/mL concentration of bacteria did not show sufficient growth in the stria to generate reproducible results on the *A. thaliana* seedlings (data not shown). The plant growth promotion activity by *B. velezensis* FZB42 on *Lemna minor* plantlets (grown in 48-well microtiter plates) was dependent on the concentration of bacterial culture filtrate (%) or the quantity of growing bacterial cells (cfu) added (Idris et al. 2007). The highest stimulatory effect on *L. minor* plantlets was using  $2 \times 10^5$  cfu of *B. velezensis* FZB42, the result was attributed to the IAA production by this strain. Also, the authors reported that the lowest dilution of bacterial culture filtrates (0.1%) had a stimulatory effect on the seedling growth, but the highest concentration of bacterial growing cells ( $1 \times 10^7$  cfu) added had a negative effect on plantlets growth (Idris et al. 2007). *B. velezensis* FZB42 (former *B. amyloliquefaciens* FZB42) inoculation ( $10^6$  cfu/mL) promoted the plant growth of *A. thaliana* under non-stress and saline conditions, the strain enhanced a 28.3% and 27.2% the shoot biomass dry weight at 0 and 100 mM NaCl compared with non-inoculated seedlings, respectively, nevertheless the effect on the root biomass dry weight was not considered in their evaluation. The inoculation of *B. velezensis* FZB42 increased the expression of auxin and photosynthesis related genes on *A. thaliana* (Liu et al. 2017a, b).

This study showed the capability *B. velezensis* 83 to synthesize in vitro antimicrobial compounds such as bacillomycin D, ISR elicitor compounds as surfactin, growth promotion compounds such as acetoin and 2,3-butanediol, and also the biopolymer  $\gamma$ -PGA (a biofilm component). The in vitro results of secondary metabolites production and *B. velezensis* 83-*A. thaliana* co-cultures assays suggest that the capacity of *B. velezensis* 83 to synthesize high concentration of  $\gamma$ -PGA and low concentration of surfactin (in contrast with *B. velezensis* FZB42) which contributed significantly to the pattern of biofilm

formation on the root and resulted in a positive effect on seedling growth. The lipopeptides and polyketides compounds have the fundamental function of inhibiting plant pathogens (Mongkolthanasakul 2012); on the other hand, surfactin is a metabolite known for its antimicrobial activity, elicitor of the plant immune response and biofilm promoter (Ongena and Jacques 2007; Jourdan et al. 2009). Some components of the culture medium such as carbon, nitrogen and metal ion sources, were determinant of the level of production of antifungal activity of *Bacillus sp.* BH072 against *Aspergillus niger*, *B. cinerea* and *F. oxysporum* (Zhao et al. 2014). The  $\gamma$ -PGA could improve the abilities of *B. amyloliquefaciens* C06 cells to attach to smooth surfaces, to form biofilm and colonies, as well as to swarm on semisolid surface in vitro, is critical for increasing the robustness and complex morphology of the colony biofilm (Yu et al. 2016). *B. subtilis*  $\gamma$ -PGA producer cells had a higher root colonization efficiency (cfu of root-associated *B. subtilis* cells per gram of collected soil) than  $\gamma$ -PGA non-producers *B. subtilis* cells. Indeed,  $\gamma$ -PGA production improves colonization efficiency of *B. amyloliquefaciens* C06 on apple surface (Liu et al. 2010). In terms of VOC production, 2,3-butanediol and acetoin of *B. subtilis* GB03 and *B. amyloliquefaciens* IN937a, can reduce infection severity of *A. thaliana* seedlings by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC1 (Ryu et al. 2004). These VOCs also trigger plant growth promotion in *A. thaliana* (Frag et al. 2013). Several VOC structures produced by *B. amyloliquefaciens* UCMB5113 were identified by GC-MS analysis, different VOC profiles were found depending on the growth medium composition (Asari et al. 2016). On the other hand, acetoin and butanediol activated the abscisic and salicylic acid signaling networks in *A. thaliana* and *Nicotiana benthamiana* (tobacco), stimulating the production of nitric oxide and hydrogen peroxide during stomatal closure, which may prevent the plant from microbial infection (Wu et al. 2018).

Phenotypic differences between strains of high genetic homology may be caused by differences in the methylation patterns of the genes as a result the presence of different restriction-modification genes between the strains. For example, the type I restriction-modification DNA-methyltransferases hsdMSR was found in *B. velezensis* UCMB5113 and At1 strains and methyltransferase BamHIM-restriction enzyme BamHI complex, was uniquely identified in *B. velezensis* UCMB5007 and UCMB5044 strains. These methyltransferases can interfere in the sequences of the promoters in the genes (i.e. in the transcriptional regulator SigA which in turn regulates other sigma factors) which affects their expression and causes phenotypic differences between the strains when faced

with environmental stimuli (Reva et al. 2019). In terms of gene expression, the *B. amyloliquefaciens* LL3 strain is a model because it is a glutamate-independent producer of  $\gamma$ -PGA and several mutants have been constructed. The mutant *B. amyloliquefaciens* LL3  $\Delta$ pgsBCA (non-producer of  $\gamma$ -PGA) showed a significant increase in the expression levels of the genes for synthesis of the antibiotics bacillaene, surfactin, iturin and fengicin (Gao et al. 2017). These authors suggest that the synthesis of these four antibiotics directly or indirectly affects the synthesis of  $\gamma$ -PGA and vice versa, in particular the synthesis of iturin and  $\gamma$ -PGA depends on the same substrate (glutamates or glutamines) and on the acetyl-coA of the TCA that is part of the synthesis machinery of both compounds. Also, the mutant *B. amyloliquefaciens* LL3  $\Delta$ srf (non-producer of surfactin), shown defects in biofilm formation and swarming, but increased  $\gamma$ -PGA production by ~24% more than *B. amyloliquefaciens* LL3 wild strain (Gao et al. 2017). *B. amyloliquefaciens* LL3 has the complete pathway for synthesis of iturin, however, the lipopeptide could not be detected in the culture medium also with the  $\gamma$ -PGA synthetase knockout strain NK- $\Delta$ Lp (non-producer  $\gamma$ -PGA), but *B. amyloliquefaciens* C2LP (derived from NK- $\Delta$ Lp) showed a considerable increase in the expression levels of the iturin synthesis genes due to the insertion of a constitutive promoter (C2up) in the iturin operon (Dang et al. 2019). *B. amyloliquefaciens* MT45 was able to achieve a tenfold surfactin production in comparison to the very close-related strain *B. amyloliquefaciens* DSM17 (Zhi et al. 2017). The high production of surfactin in *B. amyloliquefaciens* MT45 was due to factors such as: a) the amount of ABC transporter proteins in the cell (as this contributes to detoxification of surfactin and to the assimilation of glutamate); b) the overexpression of genes related to nitrogen metabolism (important for amino acid synthesis); and c) changes in central carbon metabolism and lipid synthesis. *B. amyloliquefaciens* MT45 has eight encoding genes ABC transporters and two resistance-related genes and has been suggested that they favor the production of surfactin because they provide resistance to the cells against the antibiotic. On other hand, it has been shown that ~23% of the *B. amyloliquefaciens* FZB42 genes that showed changes in expression levels in the presence of maize plant root exudates (Fan et al. 2012), were genes of unknown function of which nineteen genes were unique to the strain and 15% were hypothetical or putatively functioning proteins. Therefore it is probable that the differences observed between *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 in this work about the production of surfactin, bacillomycin,  $\gamma$ -PGA, as well as in the formation of biofilm, are



due to differences in gene regulation and expression related to the *srf*, *bmy* and  $\gamma$ -PGA gene clusters and also of unique genes as has been showed for other *Bacillus* spp. strains.

In conclusion, *B. velezensis* 83 is an efficient biocontrol agent of mango anthracnose and plant growth-promoting bacteria of maize and *A. thaliana*. *B. subtilis* 83 was reclassified as *B. velezensis* 83 according to a phylogenomic analysis. *B. velezensis* 83 genome harbors the genes to produce numerous secondary metabolites that are determinant for plant-bacteria interaction, sporulation, biocontrol and PGPB activity. *B. velezensis* 83 strain has all the necessary genes to establish a rhizosphere plant-bacteria interaction. Therefore, in addition to control foliar phytopathogens, *B. velezensis* 83 has the potential to be a biological control agent for root phytopathogens, probably eliciting ISR and promoting root growth. Our results are evidence that the *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 strains are phenotypically different, despite the fact that they have high genetic identity (>98%), and it allows us to highlight the importance of the complementarity of the genomic sequencing with in vitro test and plant assays to identify *B. velezensis* 83 as a new effective strain for biological control, plant growth promotion and glutamate-independent  $\gamma$ -PGA production.

## Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>.

**Additional file 1: Figure S1.** The pangenome model of 27 selected strains of *B. velezensis* (including *B. velezensis* 83) and *B. amyloliquefaciens* strains. **Figure S2.** Whole-comparison of species and strains of *Bacillus*. Pairwise ANIm was calculated using JSpecies (Richter et al. 2016). **Figure S3.** *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42 growth-promoting effect on *A. thaliana* seedlings. **Figure S4.** *B. velezensis* 83 vs *B. velezensis* FZB42 secondary metabolites production in liquid culture. **Table S1.** Comparative BlastP (70% coverage and 50% identity) analysis of secondary metabolites genes of *B. velezensis* 83 and *B. velezensis* FZB42. **Table S2.** Genes involved in bacterium sporulation. **Table S3.** Genes involved in plant-bacterium interactions.

## Acknowledgements

The authors thank to Celia Flores Ocampo for the excellent technical assistance to realize the chromatographic analysis of secondary metabolites produced by *B. velezensis* 83.

## Authors' contributions

All authors contributed to the study conception and design research. KB, SC, SB, MM conducted experiments. PB, RS and KB analyzed genomic data. KB wrote the original draft of manuscript. All authors reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## Funding

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 247473 and CB-251848) and by UNAM-DGAPA-PAPIIT (grants IN206715, IG200618). KABR & SACF acknowledge CONACyT for the PhD scholarships 361862 & 290773, respectively.

## Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included withing the article and its additional files.

## Ethics approval and consent to participate

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## Competing interest

The authors declare that they have no competing interest.

## Author details

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C. P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México. <sup>2</sup> Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C. P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México. <sup>3</sup> Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C. P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México. <sup>4</sup> Agro&Biotecnía S de RL de CV, Limones #8, Col. Amate Redondo, C. P. 62334 Cuernavaca, Morelos, México. <sup>5</sup> Departamento Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Carretera México- Texcoco Km. 36.5 Montecillo, Texcoco C.P. 56230, Edo. de México, México.

Received: 22 August 2020 Accepted: 30 August 2020

Published online: 07 September 2020

## References

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267
- Abriouel H, Franz CM, Omar NB, Gálvez A (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35:201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Al-Ali A, Deravel J, Krier F, Béchet M, Ongena M, Jacques P (2018) Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ Sci Pollut Res* 25:29910–29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
- Alvinda DG (2013) Improving control of crown rot disease and quality of pesticide-free banana fruit by combining *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 and hot water treatment. *Eur J Plant Pathol* 136:183. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0154-7>
- Arndt D, Grant J, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
- Asari S, Matzén S, Petersen MA, Bejai S, Meijer J (2016) Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol* 92:fw070. <https://doi.org/10.1093/femsec/fw070>
- Asari S, Tarkowská D, Rolčík J, Novák O, Palmero DV, Bejai S, Meijer J (2017) Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245:15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>
- Auchtung JM, Lee CA, Grossman AD (2006) Modulation of the ComA-dependent quorum response in *Bacillus subtilis* by multiple Rap proteins and Phr peptides. *J Bacteriol* 188(14):5273–5285. <https://doi.org/10.1128/JB.00300-06>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshtkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barrera-Ortiz S, Garnica-Vergara A, Esparza-Reynoso S, García-Cárdenas E, Raya-González J, Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J (2018) Jasmonic acid-ethylene crosstalk via *ETHYLENE INSENSITIVE 2* reprograms *Arabidopsis* root system architecture through nitric oxide accumulation. *J Plant Growth Regul* 37:438–451. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9741-3>
- Belbahri L, Chenari Bouket A, Rezik I, Alenezi FN, Vallat A, Luptakova L, Petrovova E, Oszako T, Cherrad S, Vacher S, Rateb ME (2017) Comparative

- genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. *Front Microbiol* 8:1438–1438. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2008) GenBank. *Nucleic Acids Res* 37:D26–D31. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn723>
- Bentes L, Mendes R, Cid E (2019) Promotion of maize growth using endophytic bacteria under greenhouse and field conditions. *Australian J Crop Sci* 13(12):2067–2074. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.12.p2077>
- Borriss R, Chen X, Rueckert C, Blom J, Becke A, Baumgarth B, Fan B, Pukall R, Schumann P, Spröer C, Junge H, Vater J, Pühler A, Klenk H (2011) Int J Syst Evol Microbiol 61:1786–1801. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.023267-0>
- Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20):11621–11626. <https://doi.org/10.1073/pnas.191384198>
- Brito PH, Chevreur B, Serra CR, Schyns G, Henriques AO, Pereira-Leal JB (2018) Genetic competence drives genome diversity in *Bacillus subtilis*. *Genome Biol Evol* 10(1):108–124. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx270>
- Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 28:464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Cai XC, Liu CH, Wang BT, Xue YR (2017) Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiol Res* 196:89–94. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.007>
- Cao M, Geng W, Liu L, Song C, Xie H, Guo W, Jin Y, Wang S (2011) Glutamic acid independent production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Bioresour Technol* 102:4251–4257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.065>
- Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J (2019) Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chaudhari NM, Gupta VK, Dutta C (2016) BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Sci Rep* 6:24373–24373. <https://doi.org/10.1038/srep24373>
- Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süßmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R (2007) Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnol* 25(9):1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>
- Chen L, Shi H, Heng J, Wang D, Bian K (2019) Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiol Res* 218:41–48. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.002>
- Choudhary DK, Johri BN (2009) Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance ISR. *Microbiol Res* 164:493–513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Crane JM, Gibson DM, Vaughan RH, Bergstrom GC (2013) Iturin levels on wheat spikes linked to biological control of *Fusarium* head blight by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Phytopathology* 103:146–155. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0154-R>
- Cristiano-Fajardo SA, Flores C, Flores N, Tinoco-Valencia R, Serrano-Carreón L, Galindo E (2019) Glucose limitation and glucose uptake rate determines metabolite production and sporulation in high cell density continuous cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* 83. *J Biotechnol* 299:57–65. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.027>
- Cui W, He P, Munir S, He P, Li X, Li Y, Wu Y, Wu Y, Yang L, He P, He Y (2019) Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601–Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight. *Biol Control* 139:104080. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104080>
- Dang Y, Zhao F, Liu X, Fan X, Huang R, Gao W, Wang S, Yang C (2019) Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microb Cell Fact* 18:68. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1121-1>
- Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL (2007) Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* (Oxford, England) 23:673–679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009>
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP (2015) Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:2104–2109. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000226>
- Fan B, Carvalhais LC, Becker A, Fedoseyenko D, von Wirén N, Borriss R (2012) Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol* 12:116. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-116>
- Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R (2017) *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Front Microbiol* 8:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>
- Fan B, Wang C, Song X, Ding X, Wu L, Wu H, Gao X, Borriss R (2018) *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front Microbiol* 9:1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01111>
- Farang M, Zhang H, Ryu CM (2013) Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *J Chem Ecol* 39:1007–1018. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0317-9>
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol* 285:44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez C, Allende R, Balderas K, Patiño M, Trejo M, Wong M, Rayo E, Isauro D, Jurado C (2013) The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. *Elect J Biotechnol* 16:5–5. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>
- Gallego del Sol F, Marina A (2013) Structural basis of Rap phosphatase Inhibition by Phr peptides. *PLoS Biol* 11(3):e1001511. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001511>
- Gao W, Liu F, Zhang W, Quan Y, Dang Y, Feng J, Gu Y, Wang S, Song C, Yang C (2017) Mutations in genes encoding antibiotic substances increase the synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid in *Bacillus amyloliquefaciens* LL3. *MicrobiologyOpen* 6(1):e00398. <https://doi.org/10.1002/mbo3.398>
- Guédon E, Martin-Verstraete I (2006) Cysteine metabolism and its regulation in bacteria. In: Wendisch VF (ed) *Amino acid biosynthesis ~ pathways, regulation and metabolic engineering*. *Microbiol monograph*, vol 5. Springer, Berlin
- González V, Santamaría RI, Bustos P, Pérez-Carrascal OM, Vinuesa P, Juárez S, Martínez-Flores I, Cevallos MÁ, Brom S, Martínez-Romero E, Romero D (2019) Phylogenomic *Rhizobium* species are structured by a continuum of diversity and genomic clusters. *Front Microbiol* 10(910):1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00910>
- Gordon D, Abajian C, Green P (2013) Consed: a graphical editor for next-generation sequencing. *Bioinformatics* 29:2936–2937. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt515>
- Graycar TP, Bott RR, Power SD, Estell DA (2013) Chapter 693—Subtilisins. In: Rawlings ND, Salvesen G (eds) *Handbook of proteolytic enzymes*, 3rd edn. Academic Press, Cambridge, pp 3148–3155
- Hanif K, Hameed S, Imran A, Naqqash T, Shahid M, Van Elsas JD (2015) Isolation and characterization of a  $\beta$ -proteobacterium containing phosphobacterium *Bacillus subtilis* strain KPS-11 for growth promotion of potato *Solanum tuberosum* L. *Front Microbiol* 6:583. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00583>
- Hao K, He P, Blom J, Rueckert C, Mao Z, Wu Y, He Y, Borriss R (2012) The genome of plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain YAU B9601–Y2 contains a gene cluster for mersacidin synthesis. *J Bacteriol* 194:3264–3265. <https://doi.org/10.1128/jb.00545-12>
- Hsueh YH, Huang KY, Kunene SC, Lee TY (2017) Poly- $\gamma$ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. *Int J Mol Sci* 18(12):1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms18122644>
- Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant-Microbe Interact* 20(6):619–626. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-6-0619>
- Islam S, Akanda AM, Prova A, Islam MT, Hossain MM (2016) Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Front Microbiol* 6:1360–1360. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01360>
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8(3):275–282. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>

- Jourdan E, Henry G, Duby F, Dommes J, Barthélemy JP, Thonart P, Ongena M (2009) Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:456–468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>
- Kalamara M, Spacapan M, Mandic-Mulec I, Stanley-Wall NR (2018) Social behaviours by *Bacillus subtilis*: quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Mol Microbiol* 110(6):863–878. <https://doi.org/10.1111/mmi.14127>
- Kim JD, Jeon BJ, Han JW, Park MY, Kang SA, Kim BS (2016) Evaluation of the endophytic nature of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GYL4 and its efficacy in the control of anthracnose. *Pest Manag Sci* 72:1529–1536. <https://doi.org/10.1002/ps.4181>
- Klopper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259–1266. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>
- Kuan KB, Othman R, Abdul RK, Shamsuddin ZH (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE* 11:e0152478–e0152478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL (2004) Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* 5:R12. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r12>
- Liaquat I, Ahmed SI, Jahan N (2013) Biofilm formation and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Int J Microbiol Res Rev* 4:061–067
- Liu J, He D, Li XZ, Gao S, Wu H, Liu W, Gao X, Zhou T (2010)  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface. *Int J Food Microbiol* 142:190–197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2010.06.023>
- Liu J, Moore S, Chen C, Lindsey K (2017a) Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in *Arabidopsis* root development: from experiments to systems Modeling, and back again. *Mol Plant* 10(12):1480–1496. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.002>
- Liu S, Hao H, Lu X, Zhao X, Wang Y, Zhang Y, Xie Z, Wang R (2017b) Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 7(1):10795. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11308-8>
- López D, Kolter R (2010) Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Res* 34:134–149. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00199.x>
- López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Fariás-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Inter* 20:207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-2-0207>
- Luna-Bulbarela A, Tinoco-Valencia R, Corzo G, Kazuma K, Konno K, Galindo E, Serrano-Carreón L (2018) Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biol Control* 127:145–154. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>
- Mansilla MC, Mendoza D (1997) L-Cysteine biosynthesis in *Bacillus subtilis*: identification, sequencing, and functional characterization of the gene coding for phosphoadenylylsulfate sulfotransferase. *J Bacteriol* 179(3):976–981. <https://doi.org/10.1128/Jb.179.3.976-981.1997>
- Marchler-Bauer A, Derbyshire M, Gonzales N, Lu S, Chitsaz F, Geer L, Geer C, He J, Gwadz M, Hurwitz D, Lanczycki C, Lu F, Marchler G, Song J, Thanki N, Wang Z, Yamashita R, Zhang D, Zheng C, Bryant S (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43:D222–D232. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>
- Marvasi M, Visscher PT, Martinez LC (2010) Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 313:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02085.x>
- Mitchell A, Chang HY, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, Lopez R, Finn RD (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* 43:D213–D221. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1243>
- Mongkoltharak W (2012) Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. *J Microbiol Biotechnol* 22:1597–1604. <https://doi.org/10.4014/jmb.1204.04013>
- Niazi A, Manzoor S, Asari S, Bejai S, Meijer J, Bongcam-Rudloff E (2014) Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. *plantarum* UCMB5113: a rhizobacterium that improves plant growth and stress management. *PLoS ONE* 9:e104651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104651>
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *W J Microbiol Biotechnol* 33:197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Oslizlo A, Stefanic P, Vavovec S, Beigot Glaser S, Rupnik M, Mandic-Mulec I (2015) Exploring ComQXPA quorum-sensing diversity and biocontrol potential of *Bacillus* spp. isolates from tomato rhizosphere. *Microb Biotechnol* 8(3):527–540. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12258>
- Ongena M, Jacques P (2007) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Palazzini JM, Dunlap CA, Bowman MJ, Chulze SN (2016) *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiol Res* 192:30–36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>
- Pérez-Carrascal OM, VanInsberghe D, Juárez S, Polz MF, Vinuesa P, González V (2016) Population genomics of the symbiotic plasmids of sympatric nitrogen-fixing Rhizobium species associated with *Phaseolus vulgaris*. *Environ Microbiol* 18:2660–2676. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13415>
- Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek KH (2019) *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules* 24:1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Reva ON, Swanevelter DZH, Mwita LA, Mwakilili AD, Muzondiwa D, Joubert M, Chan WY, Lutz S, Ahrens CH, Avdeeva LV, Kharkhota MA, Tibuhwa D, Lyantagaye S, Vater J, Borriss R, Meijer J (2019) Genetic, epigenetic and phenotypic diversity of four *Bacillus velezensis* strains used for plant protection or as probiotics. *Front Microbiol* 10:2610. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02610>
- Richter M, Rosselló-Móra R, Glöckner F, Peplies J (2016) JSpecies WS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32(6):929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Romero D (2013) Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 164:788–798. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.004>
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Klopper JW, Paré PW (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:1017–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Ryu CM, Hu CH, Locy RD, Klopper JW (2005) Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 268:285–292. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0301-9>
- Sha Y, Sun T, Qiu Y, Zhu Y, Zhan Y, Zhang Y, Xu Z, Li S, Feng X, Xu H (2019) Investigation of glutamate dependence mechanism for poly- $\gamma$ -glutamic acid production in *Bacillus subtilis* on the basis of transcriptome analysis. *J Agric Food Chem* 67:6263–6274. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01755>
- Schmitz S, Hoffmann A, Szekat C, Rudd B, Bierbaum G (2006) The antibiotoxic mercadin is an autoinducing peptide. *Appl Environ Microbiol* 72:7270–7277. <https://doi.org/10.1128/aem.00723-06>
- Schultz D, Wolynski PG, Ben Jacob E, Onuchic JN (2009) Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(50):21027–21034. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912185106>
- Siguier P, Filée J, Chandler M (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* 9:526–531. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.005>
- Sirisansaneeyakul S, Cao M, Kongklom N, Chuensangjun C, Zhongping S, Chisti Y (2017) Microbially produced poly- $\gamma$ -glutamic acid. *World J Microbiol Biotechnol* 33:173. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2338-y>
- Stein T, Borchert S, Kiesau P, Heinzmann S, Klöss S, Klein C, Helfrich M, Entian KD (2002) Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 44:403–416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02869>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- Tan IS, Ramamurthi KS (2013) Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep* 6:212–225. <https://doi.org/10.1111/2F1758-2229.12130>
- Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* 28(1):33–36. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33>
- Townsend GR, Heuberger JW (1943) Methods for estimating losses caused by diseases in fungicides experiments. *Plant Dis Reporter* 27:340–343
- Tsukanova KA, Chebotar VK, Meyer JJM, Bibikova TN (2017) Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *S Afr J Bot* 113:91–102. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>
- Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq BA (2016) Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—A Review. *Molecules* 21:573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Verbon EH, Liberman LM (2016) Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci* 21:218–229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.013>
- Wu L, Ma L, Li X, Gao X, Borriss R, Wu Z (2018) Acetoin and 2,3-butanediol from *Bacillus amyloliquefaciens* induce stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. *J Exp Bot* 69:5625–5635. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery326>
- Xia Y, Xie S, Ma X, Wu H, Wang X, Gao X (2011) The *purL* gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematocidal activity. *FEMS Microbiol Lett* 322:99–107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02336.x>
- Xu M, Sheng J, Chen L, Men Y, Gan L, Guo S, Shen L (2014) Bacterial community compositions of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill. seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* HYT-12–1 on tomato seedlings. *W J Microbiol Biotechnol* 30:835–845. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1486-y>
- Yan F, Yu Y, Wang L, Luo Y, Guo JH, Chai Y (2016) The *comER* gene plays an important role in biofilm formation and sporulation in both *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Front Microbiol* 7:1025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01025>
- Yu Y, Yan F, Chen Y, Jin C, Guo JH, Chai Y (2016) Poly- $\gamma$ -glutamic acids contribute to biofilm formation and plant root colonization in selected environmental isolates of *Bacillus subtilis*. *Front Microbiol* 7:1811. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01811>
- Zhao X, Han Y, Tan XQ, Wang J, Zhou ZJ (2014) Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *J Microbiol* 52:324–332. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3354-3>
- Zhi Y, Wu Q, Xu Y (2017) Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Sci Rep* 7:40976. <https://doi.org/10.1038/srep40976>

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---





## *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment

Karina A. Balderas-Ruíz<sup>a</sup>, Clara I. Gómez-Guerrero<sup>a</sup>, Mauricio A. Trujillo-Roldán<sup>b</sup>, Norma A. Valdez-Cruz<sup>b</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>c</sup>, Antonio M. Juárez<sup>d</sup>, Edibel Leyva<sup>e</sup>, Enrique Galindo<sup>a,f,\*</sup>, Leobardo Serrano-Carreón<sup>a,f,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, México

<sup>b</sup> Programa de Investigación de Producción de Biomoléculas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México

<sup>c</sup> Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, C.P. 56230 Montecillo, Texcoco, Estado de México

<sup>d</sup> Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Box 48-3, 62251 Cuernavaca, Morelos, México

<sup>e</sup> Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura "FIRA". Km. 12.5 Carretera Jiutepec-Zacatepec, Crucero de Tezoyuca, Amatlán, 62765 Emiliano Zapata, Morelos, México

<sup>f</sup> Agro&Biotecnía S. de R.L. de C.V., Cuernavaca, Morelos, México

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Bacillus velezensis* 83  
Plant growth promotion  
Biological control  
Greenhouse grown tomato

### ABSTRACT

*Bacillus* spp. are well known plant growth promoting bacteria (PGPB) and biological control agents (BCA) due to their capacity to synthesize a wide variety of phyto-stimulant and antimicrobial compounds. *B. velezensis* 83 is a strain marketed in Mexico as a foliar biofungicide (Fungifree AB™) which has been used for biological control of five different genera of phytopathogenic fungi (*Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca*, *Leveillula*) in crops of agricultural importance such as mango, avocado, papaya, citrus, tomato, strawberry, blueberry, blackberry and cucurbits, among others. In this work, the potential of plant growth promotion of *B. velezensis* 83 was evaluated on different phenological stages of tomato plants as well as the biocontrol efficacy of *B. velezensis* 83 formulations (cells and/or metabolites) against *B. cinerea* infection on leaves and postharvest fruits. Greenhouse grown tomato plants inoculated with a high concentration ( $1 \times 10^8$  CFU/plant) of *B. velezensis* 83 yielded 254 tons/Ha/year of which the 64% was first quality tomato ( $\geq 100$  g/fruit), while the control plants produced less than 184 tons/Ha/year with only 55% of first quality tomato. Additionally, *in vitro* assays carried out with leaves and fruits, shown that the *B. velezensis* 83 cells formulation had an efficacy of control of *B. cinerea* infection of ~31% on leaves and ~89% on fruits, while the metabolites formulation had an efficacy of control of less than 10%. Therefore, it was concluded that spores (not the metabolites) are the main antagonism factor of Fungifree AB™. The high effectivity of *B. cinerea* control on fruits by *B. velezensis* 83, opens the possibility for a postharvest use of this biofungicide.

### Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the vegetables with the highest production value worldwide. It is consumed in a wide variety of forms and has a beneficial impact on human health mainly due to its high content of lycopene, folic acid, ascorbic acid, flavonoids,

$\alpha$ -tocopherol, potassium, and phenolic compounds (Erba et al., 2013). In 2019, world tomato production was 180 million tons and China was the main producing country with 62 million tons, contributing 35% of total world production. In that year, México produced 4 million tons representing 2% of world production and was the country with the highest export level of tomatoes in the world (1.8 million tons), being USA,

\* Corresponding author at: Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, México

E-mail addresses: [karina.balderas@ibt.unam.mx](mailto:karina.balderas@ibt.unam.mx) (K.A. Balderas-Ruíz), [clarago@gmail.com](mailto:clarago@gmail.com) (C.I. Gómez-Guerrero), [maurotru@biomedicas.unam.mx](mailto:maurotru@biomedicas.unam.mx) (M.A. Trujillo-Roldán), [adri@biomedicas.unam.mx](mailto:adri@biomedicas.unam.mx) (N.A. Valdez-Cruz), [saranda@colpos.mx](mailto:saranda@colpos.mx) (S. Aranda-Ocampo), [amjuarez@icf.unam.mx](mailto:amjuarez@icf.unam.mx) (A.M. Juárez), [eleyva@fira.gob.mx](mailto:eleyva@fira.gob.mx) (E. Leyva), [enrique.galindo@ibt.unam.mx](mailto:enrique.galindo@ibt.unam.mx) (E. Galindo), [leobardo.serrano@ibt.unam.mx](mailto:leobardo.serrano@ibt.unam.mx) (L. Serrano-Carreón).

<https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076>

Received 31 July 2021; Received in revised form 11 October 2021; Accepted 19 October 2021

Available online 21 October 2021

2666-5174/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Germany, France, Russia and the United Kingdom, the main consumers (FAO, 2019, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>). In México, tomato is the most important vegetable produced in protected agriculture (shade net and greenhouse). Greenhouse systems are the preferred production technology for tomato production because, with this cultivation system, two to three production cycles per year can be obtained; an efficient use of water and nutrients are feasible, along with a reduction of the incidence of pests or diseases thanks to the control of environmental variables (Padmanabhan et al., 2016; Hemming et al., 2020). The area of greenhouses around of world is estimated to be 500,000 Ha (RaboResearch, 2018, <https://research.rabobank.com/>). The United State Department of Agriculture (USDA, 2021, <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-tomato-annual-4>) described in their tomato annual report that in México the total area cultivated with tomato was of 44,814 Ha (agricultural year 2020: October 2019-March 2021). In that year, the open field cultivation represented 66% of the total area planted with tomato, while greenhouse cultivation represented the 16%. However, the harvest of tomato from open field cultivation contributed with 33% of the total tomato produced that year, in contrast the harvest of greenhouse cultivation the contribution was of 40%. Other cultivation technologies such as shade mesh and tunnel contributed with the 27% of the Mexican tomato production.

Currently, farmers are interested in incorporating agroecological practices into the production systems to migrate towards organic agriculture with good yields, promote the efficient use of water and nutrients and to obtain products of high nutritional quality within the normative standards of good agricultural practices and safety. Currently, there are formulations with bacteria that act as biopesticides, biostimulants or biofertilizers, which promote plant health and plant growth, respectively (Chojnacka, 2015; Khatoun et al., 2020; Basu et al., 2021). Among these, several are based on *Bacillus* species which are well known as PGPB and BCA against various phytopathogens. In the *Bacillus amyloliquefaciens* operational group (*B. amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis* and *Bacillus velezensis*), *B. velezensis* species have been recognized as a plant-associated bacteria and they can directly or indirectly establish beneficial relationships with plants (Olanrewaju et al., 2017; Fan et al., 2017). Through direct mechanisms, *Bacillus* strains promote plant growth because they improve the uptake of nutrients such as nitrogen and phosphate, and/or by the production of phytohormones such as auxins (i.e. indole acetic acid, IAA), enzymes such as ACC deaminase or volatile organic compounds (VOC) such as 2,3-butanediol and acetoin (Asari et al., 2016; Borriss, 2016; Asari et al., 2017; Rabbee et al., 2019; Rabbee and Baek, 2020). On the other hand, by means of indirect mechanisms, *Bacillus* strains exert biological control through an antibiosis mechanism, due to the production of antimicrobial compounds such as lipopeptides and polyketides (Rabbee et al., 2019; Rabbee and Baek, 2020). Several examples of biological control with *Bacillus* strains on several species of phytopathogenic bacteria and fungi such as *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia amylovora*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani* and *Penicillium expansum*, have been reported (Fira, 2018). The biological control with *B. velezensis* also involves the competition for space and nutrients (characterized by the biofilm formation) and, in some cases, induced systemic resistance (ISR) in the plant (Fan et al., 2018; Chen et al., 2020). In this way, due to the interaction of the three different biological control mechanisms of *B. velezensis*, the incidence and severity of diseases in plants can be reduced (Fan et al., 2018; Rabbee et al., 2019). Moreover, *Bacillus* spp. form spores with high resistance to dehydration and heat, which makes them excellent candidates for formulating bio-products (Kumar et al., 2011). In México, researchers of Instituto de Biotecnología-UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México) have developed a biofungicide based on *Bacillus velezensis* 83, a formulation that it is marketed as Fungifree AB™, which has been used for the biological control of five different genera of phytopathogenic fungi (*Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Botrytis*, *Sphaerotheca*, *Leveillula*) in crops of

agricultural importance such as mango, avocado, papaya, citrus, tomato, strawberry, blueberry, blackberry, cucurbits (Balderas-Ruíz et al., 2020). However, there are no studies on *B. velezensis* 83 that provide evidence on its potential as a biostimulant. Therefore, the first objective of this work was to evaluate the biostimulant effect of *B. velezensis* 83 (Fungifree AB™) applied to the growing media (substrate) on different phenological stages of tomato, over the growth and fruit productivity of tomato plants. Fungifree AB™ has two antagonism factors: 1) *B. velezensis* 83 spores and 2) the metabolites produced during their submerged liquid culture production. Therefore, the second objective of this work was to evaluate the antagonism factor present in Fungifree AB™ having the major contribution in *B. cinerea* infection control by means of *in vitro* tests with tomato leaves and fruits.

## Materials and methods

### Biologicals

All the assays were carried out with *B. velezensis* 83 (deposited in the Belgian Coordinated Collection of Micro-organisms (BCCM), accession number LMG S-30921). A powder commercial formulation of *B. velezensis* 83 (Fungifree AB™ obtained from Agro&Biotecnia S. de R.L. de C.V.) was used. For biological control assays, the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* 05 was kindly provided by Dr. Mario A. Serrano Ortega (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM). For the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) assay, tomato seeds var. Frodo (Hybrid Tomato, ITSCO, CdMx, México) were used. All treatments described in pots come from 21 days seedlings previously germinated in the presence of  $10^4$  CFU of *Azospirillum brasilense* per seed. *A. brasilense* was obtained from Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM (Trujillo-Roldán et al., 2013). It has been previously described that the addition of *A. brasilense* in seeds provides a better seedling to be transferred to the pots (Mangmang et al., 2015; Reddy et al., 2018).

### Effect of the inoculation of different concentrations of *B. velezensis* 83 on different phenological stages of tomato

To evaluate the effect of the inoculation of *B. velezensis* 83, the concentrations evaluated were  $10^6$ ,  $10^4$  or  $10^2$  CFU of *B. velezensis* 83/g substrate in two treatments: seed germination and seedlings with 20 days of development (20 DD). Each treatment included 25 individuals (seeds or seedlings); the control was the support growing media (Peat Moss) without *B. velezensis* 83 inoculation, here 24 seeds were used. The support growing media was a commercial Peat Moss based medium (Sunshine Mix 3, Sun Gro Horticulture, Agawam, MA) which was previously sterilized (121 °C/30 min) before use. For this assay, tomato seeds var. Frodo were sown in germination trays and were kept in a culture room with controlled conditions at 25 °C and photoperiod of 18 h light/6 h dark. The percentage of germinated seeds in each treatment was evaluated 10 days after sowing, at that time >95% of the control seeds were germinated as declared by the supplier. From the appearance of the first true leaf of the seedlings (after 7 days), these were watered with a Hoagland solution (1/4) according to the requirements of the seedling (every 48 h) (Hoagland and Arnon 1938). The germination process lasted 28 days until the seedlings reached the appropriate size for transfer to pots. The effect of each treatment was evaluated in terms of biomass dry weight (80 °C for 48 h) for root and shoot.

In order to detect the population of *B. velezensis* 83 in 28 days tomato seedling roots, the population of *B. velezensis* 83 was quantified by qPCR analysis, for this, two Cq curves were performed. The first curve was a standard curve (Cq vs log [DNA]) to evaluate the amplification efficiency (E) of primers designed to *B. velezensis* 83 DNA identification. To obtain the DNA from *B. velezensis* 83 cells, a culture of the strain was incubated in 250 mL flasks with 50 mL of YPG medium, for 12-15 hours at 29 °C and 200 rpm (Innova 4330 refrigerated incubator shaker, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). After this time, 1.0 mL of the

culture was taken and centrifuged (centrifuge 5810 R, Eppendorf Hamburg, Germany) at 10,000 rpm (rotor F45-30-11 Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 3 min, resulting in 100  $\mu$ L of the supernatant and the cell pellet in the centrifugation vial. Subsequently, 100  $\mu$ L of lysozyme (10 mg lysozyme Sigma-Aldrich in 1 mL of TE buffer pH 8.0 Sigma-Aldrich) were added to the samples. Subsequently, this mixture was incubated at 37 °C for 45 min (thermomixer model R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Once the sample was at room temperature, the DNA of *B. velezensis* 83 was extracted with the chloroform-phenol method (Moore and Dowhan, 2002). For DNA amplification, the *yomR*-Bs83F / *yomR*-Bs83R molecular markers were designed with the Primer Express version 2.0 software, starting from a 221 bp sequence of the *yomR* gene region of strain 83 this sequence was selected because the less identity with the *yomR* gen from other *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* using Blastn analysis. The *yomR*-Bs83 oligos (*yomR*-Bs83F: ATGAAACAGCTGCCGAGC / *yomR*-Bs83R: CTGCCCTGCATTC-CATTGT) were used as a mixture contained in a concentration of 5  $\mu$ M each one. All qPCR reactions were carried out by triplicate and the control was a mixture reaction without DNA (NTC) in a thermal cycler equipment (thermal cycler model C1000, Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA). An amplification standard curve (Cq vs log [DNA]) was obtained for these primers with a dynamic working range from 60.0 to 0.0006 ng/ $\mu$ L of DNA ( $y = -3.3793x + 20.255$ ;  $r^2 = 0.9993$  and  $E = 97.7\%$ ). The detection limit is 0.0006 ng/ $\mu$ L in the Cq 31. The Cq of the NTC was 37.

The second curve was a standard curve (Cq vs log [CFU]) to quantify the *B. velezensis* 83 CFU/root, for this, firstly a culture of strain 83 was done and serial dilutions were made in order to obtain cell suspensions with different concentrations in the range of  $10^9$ - $10^1$  CFU/mL. With the plate counting method, the value of CFU/mL of these suspensions was determined. Likewise, DNA extraction from 1.0 mL of the same cell suspensions was carried out with the chloroform-phenol method. It is worth mentioning that with suspensions of theoretical concentrations below the order of  $10^1$  CFU/mL, the CFU of the bacteria could not be detected with the plate count method. The dynamic working range was from  $4.8 \times 10^7$  CFU/mL ( $4.8 \times 10^5$  CFU/reaction) to  $3.5 \times 10^2$  CFU/mL ( $3.5$  CFU/reaction),  $y = -3.3266x + 42.35$  with  $r^2 = 0.992$  and  $E = 99.8\%$ . Therefore, the minimum detection limit with oligos *yomR*-Bs83 F/R was  $3.5 \times 10^2$  CFU/mL in Cq 33, which would correspond to a concentration of 0.00012 ng of *B. velezensis* 83 DNA. The samples were analyzed in triplicate and the control was a mixture without DNA (NTC). Cq of the NTC was 37. To detect the population of *B. velezensis* 83 in the seedling roots, all the root of each seedling grown during 28 days in a germination tray was used. The root wet weight was recorded and later the root was subjected to a sonication (3 min, Branson Ultrasonics M3800 Thermo Fisher Scientific, USA) washing process in a Corning 10 mL tube containing 5 mL of deionized water, from this cellular suspension 1 mL was used for *B. velezensis* 83 cell disruption by performing 3 freezing-heating cycles by placing the tube in liquid nitrogen (1 min)-hot water (3 min, 55 °C, thermomixer model R, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). A reaction volume of 10  $\mu$ L was used using SYBR Green I reagent (SYBR 5  $\mu$ L, water 3  $\mu$ L, primers mix 1  $\mu$ L, DNA sample 1  $\mu$ L). The samples were analyzed in triplicate and the control was a mixture without DNA (NTC). Cq of the NTC was 37. Finally, the population of *B. velezensis* 83 was calculated using the  $y = -3.3266x + 42.35$  equation obtained from the standard curve of Cq vs log [CFU], the result was multiplied by 5 (the water volume used for the root washing process) and reported as CFU/root.

#### Effect of the application of *B. velezensis* 83 in tomato plants grown in greenhouse

This assay was carried out in a greenhouse (area of 360 m<sup>2</sup>) located in the Centro de Desarrollo Tecnológico from FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura), in Morelos, México. The greenhouse was designed and built for the implementation of a 12-point

monitoring system coupled to a PID (proportional integral derivative) feedback control system for temperature, a solar curtain control system, a control system for wet wall operation, a sprinkler system, and a fertigation system, coupled to three exhaust fans and two active ventilation walls which allowed maintaining the tomato crop in controlled environmental conditions. The information generated in the automated monitoring and control process was stored and processed in a central concentrator (PC computer). Each of the 12 monitoring points measured temperature, relative humidity (RH), solar radiation, pH and conductivity in the substrate. The control was programmed to avoid abrupt departures on extremely hot or cold days by using reference ranges of temperature (14 °C to 34 °C), RH (23% to 83%) and a maximum light near of 3000 footcandles (~33,000 lux). The fertigation input pH was controlled between 6.3 to 6.4, with a percolation pH between 7.5 to 8.1, as well as an electrical conductivity between 0.5 dS/m up to 3.0 dS/m, depending on the cultural stage of the tomato (Table 1).

Tomato seedlings var. Frodo with 21 days of development were transplanted to 15 L pots in the greenhouse with a mixture of substrate based on coconut fiber: tezontle (30:70). For each pot, two seedlings were placed. The density of the crop was 2.8 plants/m<sup>2</sup> with 60 plants/treatment and 61 plants for the control. The crop had a cycle (winter cycle) of 150 days. In the assay, two biostimulation treatments were applied by drench (100 mL) to the substrate close to the root system. The effect of *B. velezensis* 83 treatments with high or low CFU/plant were evaluated (Table 2). The biological treatments also included the foliar aspersions to the shoot system. These treatments were applied from the beginning (02<sup>nd</sup> October, 2017, being the day of seedling transplanting) to the end (5<sup>th</sup> March, 2018) of the tomato cultivation cycle in the greenhouse in order to cover all the phenological stages the tomato plant, therefore the plants had six applications of *B. velezensis* 83 substrate treatment (applied at day 25, 50, 75, 100, 125 and 150 after seedling transplanting) and ten of *B. velezensis* 83 foliar aspersions (applied at day 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98, 112, 126 and 140 after seedling transplanting). The sprayed volume of each suspension treatment was increasing during the experiment depending on the growth of the plants in the greenhouse in order to moisten all the foliage of each plant included in the experiment. A minimum of 2 L/treatment (33 mL/plant) were applied to the plants at the beginning of the experiment and 4 L/treatment (66 mL/plant) at the end, thereby with a theoretical calculation it was estimated that a minimum of  $6.7 \times 10^7$  CFU/plant and maximum  $1.3 \times 10^8$  CFU/plant were applied. The control were plants without bacterial inoculation (without biological treatment to substrate nor shoot) but with chemical fungicides (Previcur energy™, Bayer Crop Science, Germany and Velsul 725™, Velsimex, México) as preventive treatment. The chemicals were applied only once in the tomato cultivation cycle (seven days after transplanting of seedlings).

The vegetative variables of tomato growth as height (cm) and stem diameter (cm) were measured from 40 to 90 days after transplanting, this interval of time was considered to cover the vegetative plant growth phase. The diameter was measured in the first centimeter of the base of the stem. The productive variables were the number of fruits per plant and weight of fruit per plant. The tomato harvest lasted 65 days (from 30<sup>th</sup> December until 5<sup>th</sup> March), the fruits were harvested every three or four days. For year-productivity calculation two identical complete cycles were supposed.

#### *In vitro* biological control assays using *B. velezensis* 83 antagonism factors vs *B. cinerea* in tomato leaves and postharvest fruit

Fungifree AB™ is a powder formulation that contains two antagonism factors: spores of *B. velezensis* 83 and metabolites synthesized during the production process of the spores. Therefore, *in vitro* tests for biological control of *B. cinerea* 05 were performed using tomato leaves and fruits using treatments that included: 1) *B. velezensis* 83 spores (spores + inert powder support), 2) *B. velezensis* 83 metabolites (supernatant + inert powder support) and 3) Fungifree AB™ formulation

**Table 1**Nutritional requirements of the tomato crop (*Solanum lycopersicum L.*) in parts per million (ppm) by phenological stage proposed by FIRA staff.

Phenological state	Steiner Nutritive solution used by phenological stage (ppm)												
	$\sigma$ (dS/m)	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn	Cu	B	Mo
Transplant	0.5	42	8	68	45	12	28	3	0.5	0.05	0.5	0.025	0.002
Vegetative-Flowering	1.0	84	16	137	90	24	56						
Flowering – start of fruiting	1.5	126	23	205	135	36	84						
	2.0	168	31	273	180	48	112						
fruiting – 1st harvest	2.5	210	39	341	225	60	140						
Harvest	3.0	252	47	410	270	72	168						

 $\sigma$  (dS/m): electrical conductivity (decisiemens per meter)**Table 2**

Treatments used in greenhouse grown tomato plants.

Treatment	Active ingredient	Concentration	Application interval
Fungifree AB™ substrate low +shoot	<i>B. velezensis</i> 83	$1 \times 10^6$ CFU/plant + $6.7 \times 10^7 < 1.3 \times 10^8$ CFU/plant	substrate (to the root system) every 25 days + foliar aspersion (to the shoot system) every 14 days
Fungifree AB™ substrate high +shoot	<i>B. velezensis</i> 83	$1 \times 10^8$ CFU/plant + $6.7 \times 10^7 < 1.3 \times 10^8$ CFU/plant	substrate (to the root system) every 25 days + (to the shoot system) foliar aspersion every 14 days
Control	Chemical Fungicides	Previcur energy™ (0.5 mL/L) Velsul 725™ (3 mL/L)	foliar aspersion (to the shoot system)

(spores + supernatant + inert powder support). Fungifree AB™ inert powder support was used as control. The treatments suspension with cells or with metabolites of *B. velezensis* 83 were prepared according to the recommendation of use for foliar application of Fungifree AB™ (2 g/L). The metabolite suspension was filtered (0.20  $\mu$ m membrane) in order to evaluate the metabolites inhibition effect without residual cells interference. Chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) (3 g/L) treatment was included as a positive control. A *B. cinerea* 05 spores suspension ( $1 \times 10^6$  spores/mL) was used as infective inoculum, for leaves the suspension was prepared with using PDB media (at 25%) to favor the fungal growth and for fruit it was prepared using sterile water.

For biological control *in vitro* assays carried out with leaves, healthy tomato seedling leaves with 30 days of growth were used. To carried out the experiment, two leaves were placed in a petri dish with agar (13 g/L) to make a system that maintain RH and three petri dishes were used for each treatment. Each leaf was divided in half (considering the central midrib of the leaf as a natural division) and three 10  $\mu$ L drops of the corresponding treatment or control were applied on each side of the leaf. Once the applied drops had dried, the leaves were placed inside a Petri dish with agar and were sealed with Parafilm™ and placed in an incubator (Benchtop Environ-Cab 680, Lab-Line Instruments, Inc., USA) at 29 °C for 48 h. After this incubation time, three 10  $\mu$ L drops of a spore suspension of *B. cinerea* 05 were applied on each side of the leaf, trying to inoculate in the same site of application of the treatments. Once the drops were dry (approx. 10 min), the Petri dishes were again sealed with Parafilm™ and wrapped with brown paper to maintain the RH in the Petri dish and avoid light filtration (to favors the development of infection of the phytopathogen). Finally, the Petri dishes were again stored in the incubator (Incubator Heratherm iGS400, Thermo Fisher

Scientific Inc., Waltham, USA) at 25 °C at 90 RH% for 72 h, these conditions were used to favor the development of infection of the fungus. The area of lesion caused by *B. cinerea* 05 on the leaf was measured by using an image analysis technique using the Image ProPlus™ system (Media Cybernetics, Rockville, USA). The method used is based on the identification of color contrasts between the infected and non-infected areas of the leaf. This allowed us to have high precision when determining the severity of the infection caused by *B. cinerea* 05 on the leaf.

For biological control *in vitro* assays carried out with fruits, healthy tomatoes with four days postharvest were used. To carried out the experiment, 10 fruits were used for each treatment. All the fruits were superficially disinfected with commercial chlorine (5 mL/L for 15 min), once disinfected, each fruit was wounded in two equidistant points using a sterile toothpick (a wound of 3 mm deep). One point was inoculated with 10  $\mu$ L of the treatments (cells, metabolites or Fungifree AB™), and the other point was inoculated with 10  $\mu$ L of the control (inert powder support in distilled water, 2 g/L). Then the fruits were carefully placed in beakers (5 L), next the beaker was wrapped with paper to avoid light exposition and finally stored in an incubator (Benchtop Environ-Cab 680, Lab-Line Instruments, Inc., IL, USA) at 29 °C for 12 h. After this time, the wounds were inoculated with 10  $\mu$ L of spore suspension of *B. cinerea* 05. The tomatoes were again stored in the beakers, this time were wrapped with paper to avoid light exposition and finally were placed in an incubator (Incubator Heratherm iGS400, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) at 25 °C for 3 days at 90% RH. The fungal infection on the fruits was evaluated by measuring the diameter (average of horizontal and vertical diameter) of injury on fruit and then infection area was calculated assuming a circumference.

The efficacy of inhibition of *B. velezensis* 83 against *B. cinerea* 05 in leaves and fruit was calculated according to:

$$\text{Efficacy (\%)} = \left[ 1 - \left( \frac{it}{IT} \right) \right] \times 100$$

Where:

IT= area in the control

it= area in the treatment

### Profitability

The yields and the unit cost of production (CUP) of the greenhouse grown tomato were calculated for each treatment. The cost of production involved the variable and the fixed costs. The variable costs were constituted by the cost of inputs (biological and chemical products) and the direct labor cost. The fixed costs were: greenhouse rent with all the services, equipment and tools. In order to calculate the income, a sale price of 0.3 USD/kg was considered (SIIN, 2018, <http://www.economia-sniim.gob.mx/>).

### Statistical analysis

All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey comparison procedure assuming equal variances using Minitab™ 17 Statistical Software (Minitab, LLC, Pennsylvania, USA). In the



graphics the mean (bars) and the standard deviation (error bars) are reported. Significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## Results and discussion

### Effect of *B. velezensis* 83 inoculation on tomato seed germination

In addition to the *in vitro* test to evaluate the synthesis of related plant growth-promoting compounds, other criteria used to evaluate a strain as PGPB are the effect on seed germination and on the seedling growth. Then, the first objective of this work was to establish the application scenario of *B. velezensis* 83 to the growing media Peat Moss based (substrate) to evaluate the effect of the bacteria when it is present in germination or in the root of the tomato seedling. In the range of CFU/g substrate evaluated ( $10^2 - 10^6$ ) no significant differences were found on the percentage of seed germination (supplemental Fig. S1a). It was observed that when the application was made from the germination of the seed, the treatment with a higher cell concentration of the bacteria inoculated to the substrate caused a delay in the development of the seedling (observed at 10 Days After Sowing, DAS). The germinated seeds in the condition of the treatment with  $10^6$  CFU/g substrate barely showed the leaves of the cotyledons at 7 DAS, while at lower concentrations of *B. velezensis* 83 ( $10^4$  and  $10^2$  CFU/g substrate), the emergence of the first true leaf in the tomato seedlings was observed and presented similar appearance to the seedlings without application of *B. velezensis* 83 (control). The first true leaf was first observed in seedlings treated with  $10^4$ ,  $10^2$  CFU/g substrate and also in the control seedlings after 7 days. For seedlings treated with  $10^6$  CFU/g substrate the first true leaf was observed after 10 days (supplemental Fig. S1b). A strong negative effect on root biomass was observed even at low bacterial dose ( $10^2$  CFU/g substrate) while the negative effect on shoot biomass was only evident at high bacterial dose ( $10^6$  CFU/g substrate). In contrast, to apply  $10^6$ ,  $10^4$  or  $10^2$  CFU/g substrate to the seedlings had no effect on root and shoot growth (Fig. 1). Using a qPCR-based method developed specifically for the detection of *B. velezensis* 83 DNA (Supplemental material Fig. S2), the population established in each seedling root with 28 days of growth was quantified. It was found that *B. velezensis* 83 population was established in the range of  $5 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  CFU/root when it was present from the seed germination stage, while when *B. velezensis* 83 was applied to 20 DD seedlings, the bacterium was detected at  $3 \times 10^4$  CFU/root only in the seedlings treated with  $10^6$

CFU/g substrate (Fig. 2), no statistical differences were found among treatments.

The seed germination is affected by several factors, but mainly by plant hormones such as abscisic acid (ABA), ethylene, gibberellins, auxins (*i.e.* IAA), cytokinins and brassinosteroids (Miransari and Smith, 2014). It has been observed (Wagi and Ahmed, 2019) that strains have different capacity to produce auxins depending on the composition of the culture medium, the strains *Bacillus cereus* (So3II) and *B. subtilis* (Mt3b) showed different production of IAA depending on availability of tryptophan (IAA precursor) in the growth media. On the other hand, production of auxins by beneficial microorganisms promotes the interaction with the plant, as well as the jasmonic acid dependent plant resistance, which affects the expression of genes involved in auxins synthesis and transport (influx and efflux carriers) (Tsukanova et al., 2017). Also, it has been reported (Pérez-Flores et al., 2017) that VOC such as acetoin emitted by *Bacillus methylotrophicus* M4-96 affected the auxins genes expression and promoted the primary root growth and lateral root formation in *A. thaliana*. It has been observed (Asari et al., 2016) that in a medium containing *A. thaliana* root exudate, the VOC of

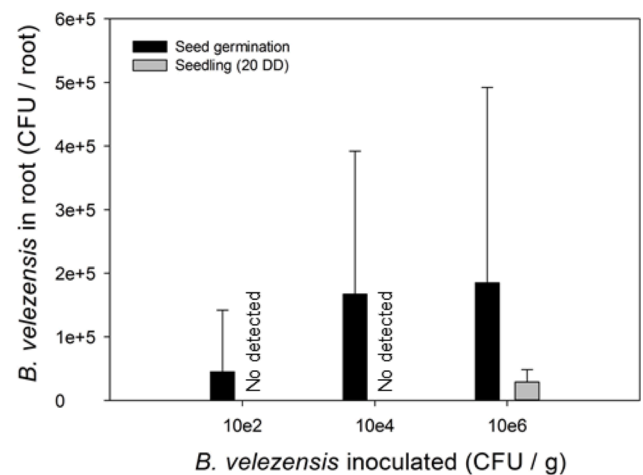


Fig. 2. Population of *B. velezensis* 83 on seedling root (28 days of growth) detected by qPCR. Different letters mean significant differences according to ANOVA and Tukey  $\alpha = 0.05$ .

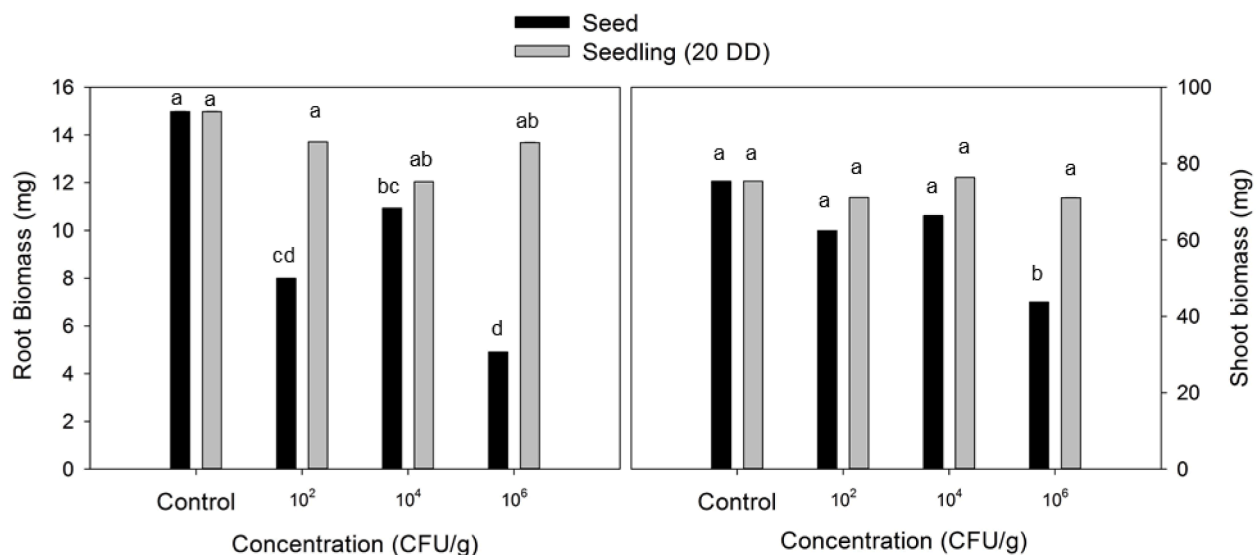


Fig. 1. Effect on root and shoot biomass of tomato Frodo seedlings (28 days of growth) of *B. velezensis* 83 inoculation to the substrate (using a concentration of  $10^2$ ,  $10^4$  or  $10^6$  CFU/g substrate). Control: substrate without inoculation of bacteria. a) *B. velezensis* 83 substrate inoculation in seed germination stage and b) *B. velezensis* 83 substrate inoculation in seedling (20 DD) stage. Different letters mean significant differences according to ANOVA and Tukey  $\alpha = 0.05$ .

*B. amyloliquefaciens* UCMB5113 increased 3-fold the plant biomass, regardless of the number of inoculated bacteria. However, without *A. thaliana* root exudate, the VOC of *B. amyloliquefaciens* UCMB5113 increased 2-fold the plant biomass and caused a negative effect on shoot biomass as the number of bacteria increased. Moreover, the crosstalk of auxins with the other plant hormones (*i.e.* cytokinin and ethylene) is complex and it affects several physiological processes in the plant at the same time (Liu et al., 2017a, Liu et al., 2017b). The plant growth promotion does not only depend on auxins production, but other factors could also be involved in the biostimulation of plant growth caused by a PGPB. In addition to IAA synthesis, phosphate solubilization, HCN, siderophore and NH<sub>3</sub> production, the antifungal activity on phytopathogenic fungi and the mitigation abiotic stress, were the characteristics associated to the increased percentage of seed germination and seedling growth promoted by *Bacillus* strains inoculated in tomato (Ramavath et al., 2019). The biofilm formation (involving the synthesis of protein fibers (TasA) and exopolysaccharides (EPS) production by PGPB *Bacillus* strains) has been found as an important trait of *B. amyloliquefaciens* 54 in root colonization and to induce drought tolerance in tomato plants (Wang et al., 2019). The EPS production has been shown to be determinant for the capacity of *B. velezensis* FZB42 to biofilm formation and therefore for tomato root colonization (Al-Ali et al., 2018). Nevertheless, the exacerbated biofilm of *B. velezensis* FZ42 has also been observed negatively to affect the *in vitro* growth of *A. thaliana* seedlings (Balderas-Ruíz et al., 2020). On the other hand, the strains could have different capabilities for plant growth promotion and sometimes, also a decrease in some seedling growth parameters can be observed (*i.e.* shoot length and root dry weight) (Hernández-Pacheco et al., 2021). It has been suggested that plant growth promotion effect of *B. velezensis* FZB42 on *Lemna minor* was associated to auxin production compounds by the bacteria; however, only the diluted bacterial culture filtrates or the inoculation of low concentration of *B. velezensis* FZB42 ( $1 \times 10^5$  CFU) exhibited a plant growth promotion effect on *in vitro* cultured *L. minor* plantlets. The inoculation of high concentration of bacteria ( $1 \times 10^7$  CFU) had a negative effect on the plantlets growth (Idris et al., 2007). It is important to keep in mind that a PGPB can also exhibit a plant host specificity, as it has been shown with *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Enterobacter* strains isolates from tomato, only a positive growth promotion effect was observed in tomato plants, in contrast, when they were inoculated in groundnut, sorghum and chickpea had a negative or no growth promotion effect.

The plant growth promotion effect of *B. velezensis* 83 has been observed in *A. thaliana* as the increase of root and shoot biomass, and in maize as an increase of the plant height and root biomass (Balderas-Ruíz et al., 2020). Nevertheless, in the present work, it was not observed that *B. velezensis* 83 inoculation increased the root or shoot biomass for the tomato (Frodo variety) with different treatments (concentration) applied to substrate in the seed germination stage or to the substrate of growing seedling stage. However, the high concentration of bacteria inoculated in the substrate, caused a negative effect on the development of shoot and root of tomato seedlings as it has been observed in other plant-PGPB interaction models (Idris et al., 2007; Vaikuntapu et al., 2014; Balderas-Ruíz et al., 2020). Tomato exudates are mainly composed of sugars and organic acids, the latter being of higher concentration in the exudates, both types of compounds increase as the plant grows. The major organic acids are represented by citric, succinic and malic acids, while fructose and glucose are the major sugars (Kamilova et al., 2006). It has been reported (Tan et al., 2013) that the chemoattractant property of tomato exudates is positively correlated to exudates concentrations, the malic acid was one of the main compounds that promoted chemotaxis, swarming and establishment of *B. amyloliquefaciens* T-5 in tomato root. Additionally, the concentration of malic acid could be higher in roots of 4-day-old seedlings than in those of 21-day-old seedlings (Kamilova et al., 2006). On the other hand, it has been observed (Tan et al., 2013) an increase of up to an order of magnitude in the population level (CFU/g root) of *B. amyloliquefaciens*

T-5 in tomato roots between 7- and 14-days post-inoculation of PGPB when malic acid was present in the rhizosphere of tomato plants. Therefore, it is probable that *B. velezensis* 83 establishment in the roots seedlings when the bacteria was present from the beginning of seed germination was associated to the differential concentration of organic acids (as malic acid) in tomato root. *B. velezensis* 83 has been isolated from mango tree foliage, the strain has the capability to form robust biofilms, and, in addition, genes to produce IAA, siderophore, phytase, acetoin/2,3-butanediol are present in its genome, as well as several genes involved in carbohydrate metabolism and plant cell wall degradation, which allows to *B. velezensis* 83 to establish a beneficial plant-bacteria interaction (Balderas-Ruíz et al., 2020). Considering the results obtained in this work, the next hypothesis is proposed: for inoculation on seed germination stage 1) *B. velezensis* 83 produced a plant growth promoter compound (plant hormone or VOC) that affected the seed germination stage then all the plant growth or 2) *B. velezensis* 83 inoculated in high concentration quickly established the biofilm (involving cells and EPS) and affected the root development, therefore the nutrients uptake. More investigation is being done to study this phenomenon.

Effect of the application of *B. velezensis* 83 in tomato plants grown in greenhouse

Fig. 3 shows plant growth (height and stem diameter) of the plant as a function of *B. velezensis* 83 inoculum (CFU/plant). The height of the

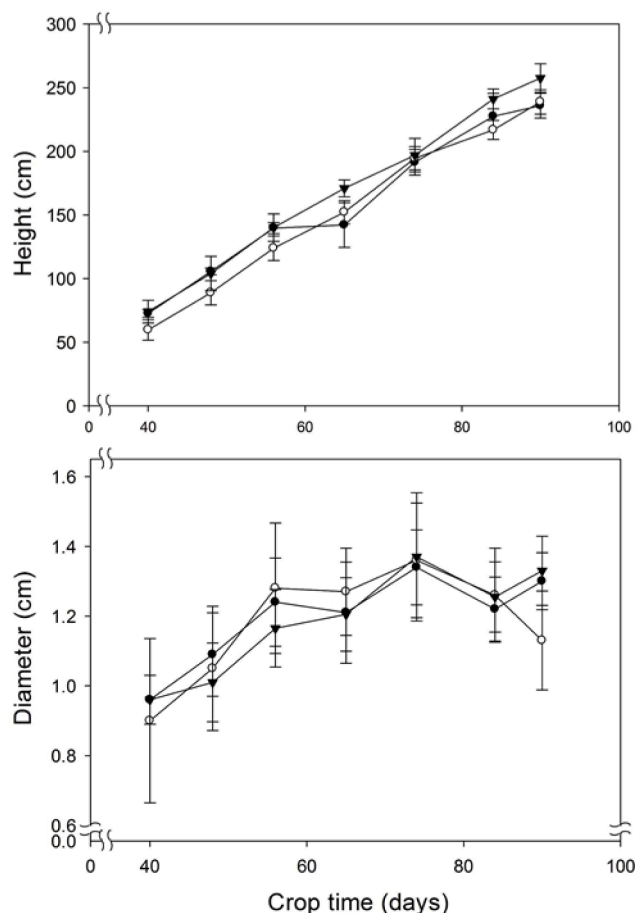


Fig. 3. Effect of bioestimation (*B. velezensis* 83) on the growth of tomato plants in the greenhouse. a) stem diameter (mm) and b) height (cm). Bv 83 low (●): *B. velezensis* 83 in  $1 \times 10^6$  CFU/plant, Bv 83 high (○): *B. velezensis* 83 in  $1 \times 10^8$  CFU/plant, and control (▼): plants without application of bacteria in substrate.

plants linearly increased in the period going from 30 to 90 days of growth after transplanting the seedlings, the diameter of the plants increased until day 74. In both growth parameters, no significant differences were found between the treatments and the control plants. In contrast, a strong plant growth promotion effect of *B. velezensis* 83 was observed on the fruit productivity (Fig. 4). With a high bacterial inoculum ( $1 \times 10^8$  CFU/plant) treatment, the plants produced 4.5 kg/plant ( $12.7 \text{ kg/m}^2$ ) while production in control plants only achieved 3.3 kg/plant ( $9.2 \text{ kg/m}^2$ ) (Fig. 4a). In such conditions, the plants produced an average of 79 fruits/plant while control plants produced only 63 fruits/plant (Fig. 4b), and no significant differences in tomato production were found when the plants were inoculated with a low concentration ( $1 \times 10^6$  CFU/plant) treatment. Nevertheless, more interesting was the fact that high inoculum of *B. velezensis* 83 not only increased tomato productivity but also the quality of the fruits. While in control plants 27 first quality fruits/plant were obtained with the *B. velezensis* 83 treated plants (high inoculum) it was possible to obtain 37 first quality fruits, which represents an increase of 69% of the number of first quality fruit. Tomato production with the treatment *B. velezensis* 83 in high concentration was an estimate of 254 tons/Ha•year (Fig. 4c) and the differences were significant with respect to the other treatments. With the high concentration substrate treatment, it was possible to produce 164 tons/Ha•year of first quality tomato ( $\geq 100 \text{ g/fruit}$ ), which represented the 64% of the total production/year, while with the low concentration substrate treated (211 tons/Ha•year) and control (184 tons/Ha•year) plants produced less than 125 and 101 tons/Ha•year of first quality fruits, respectively. These results represent an increase of 38% in the productivity of tomato plants as well as a 19% increase in the quantity of first quality fruits. Additionally, it was observed that with a high concentration substrate treatment, the cumulated production of 1<sup>st</sup> quality tomato fruits was always higher compared to other treatments (Fig. 5), in the first eighteen days of harvest time, the harvest of first quality tomato fruits was about 13.6 kg while the low concentration substrate treatment and the control were only less than 1.0 kg. The cumulated production (kg) of 2<sup>nd</sup> quality tomato fruits also was higher than the low concentration substrate treatment and the control, and the 3<sup>rd</sup> quality tomato fruits was very similar for all the treatments; however, as showed before (Fig. 5), there was not significant differences in the tomato productivity. These results have shown the significant beneficial impact of *B. velezensis* 83 inoculation on tomato fruit productivity and quality, which, in turn, represents an economical benefit to the producers. The CUP of the greenhouse grown tomato with the *B. velezensis* 83 the high concentration substrate treated was of 0.3 USD/kg, while with a low concentration treatment or the control the CUP were 0.37 USD/kg and 0.4 USD/kg, respectively. Using these calculations it was estimated that the profitability was 65% for greenhouse grown tomato with the *B. velezensis* 83 high concentration treatment and 25% for tomato control.

It has been proposed (Basu et al., 2021) that an ideal PGPB should have the following characteristics: to be highly rhizosphere-competent and eco-friendly, to colonize the plant roots in significant numbers upon inoculation, to promote plant growth, to exhibit a broad spectrum of action (for biological control), to be compatible with other bacteria in the rhizosphere, as well as to be tolerant of physicochemical factors like heat, desiccation, radiations, and oxidants, also, it should demonstrate better competitive skills over the existing rhizobacterial communities. The use of *Bacillus* spp. inoculation has been extensively investigated due to the positive effect on crop production, this is in part because some strains help to the plants to cope with the biotic and abiotic stress; therefore, they are used as a sustainable choice against the use of agrochemicals. Unfortunately, few studies have evaluated the effect of bioinoculants on crop productivity. Factors as physiological growth stage of *Bacillus* sp. (planktonic cells or biofilm cells) and the nutrients (as Fe or iron) availability in the nutrient solution for greenhouse-grown tomato, have been shown to affect several plant growth parameters (height, root dry weight, shoot dry weight, root length, leaf area,

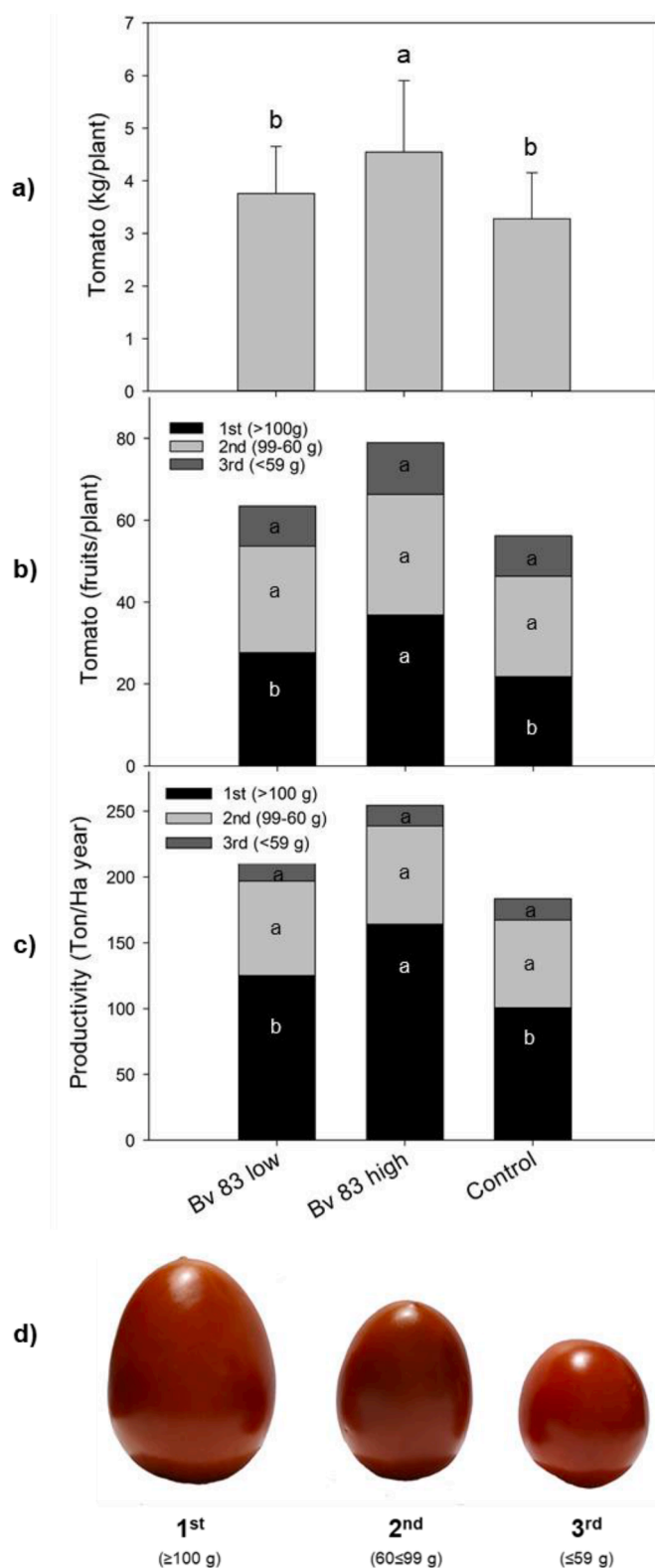


Fig. 4. Effect of bioestimulation (*B. velezensis* 83) on the productivity of the tomato crop in the greenhouse depending on the treatment. Bv 83 low: *B. velezensis* 83 in  $1 \times 10^6$  CFU/plant, Bv 83 high: *B. velezensis* 83 in  $1 \times 10^8$  CFU/plant, and control: plants without application of bacteria in substrate. a) tomato production (Kg/plant). b) Number of tomato fruits/plant produced by quality category depending on the treatment. c) Tomato productivity (tons/Ha•year) and fruit quality. d) Fruit quality: 1<sup>st</sup>  $\geq 100 \text{ g}$ , 2<sup>nd</sup>  $60 \leq 99 \text{ g}$  and 3<sup>rd</sup>  $\leq 59 \text{ g}$ . Different letters mean significant differences according to ANOVA and Tukey  $\alpha = 0.05$ .

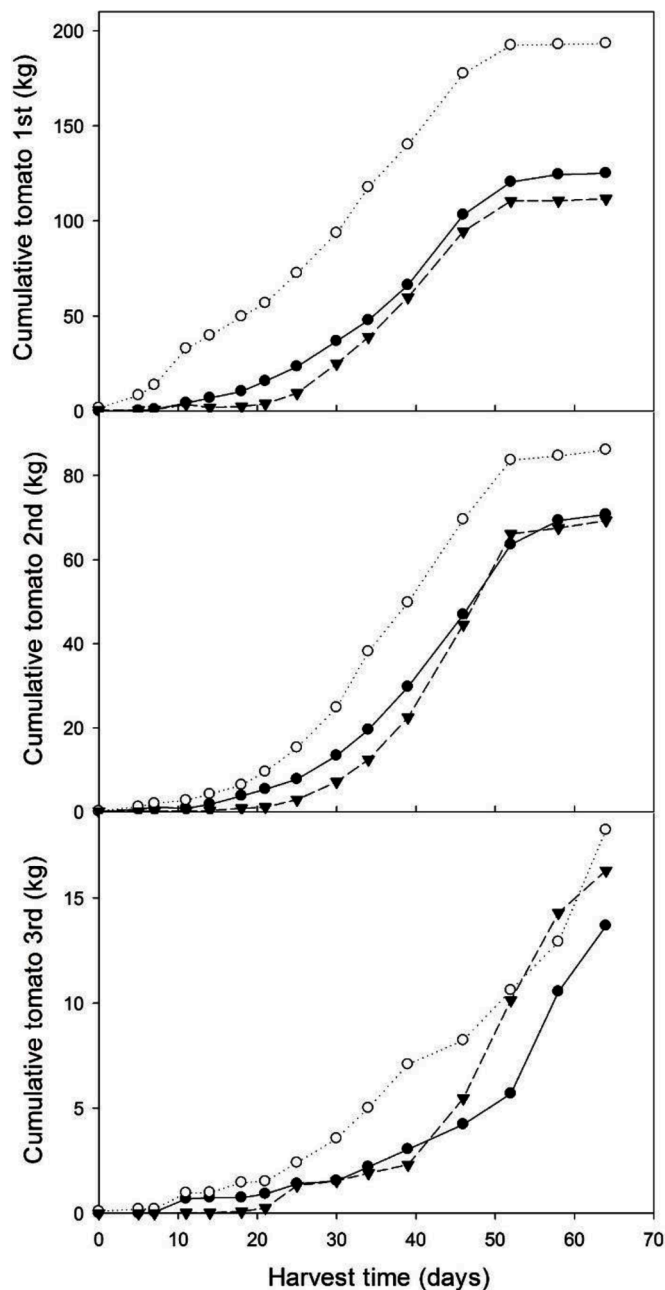


Fig. 5. Cumulative tomato production (Kg) in the greenhouse depending on the treatment. Bv 83 low (●): *B. velezensis* 83 in  $1 \times 10^6$  CFU/plant, Bv 83 high (○): *B. velezensis* 83 in  $1 \times 10^8$  CFU/plant, and control (▼): plants without application of bacteria in substrate. Fruit quality: 1<sup>st</sup>  $\geq 100$  g, 2<sup>nd</sup>  $60 \leq 99$  g and 3<sup>rd</sup>  $\leq 59$  g. Different letters mean significant differences according to ANOVA and Tukey  $\alpha = 0.05$ .

number of leaves) and tomato fruit production (Ricci et al., 2019). The growth promotion activity of different species of PGPB was compared (Hernández-Pacheco et al., 2021) in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and in some interactions of PGPB-plant, the growth promotion effect was observed as an increased primary length root and increased number of secondary roots. However, these parameters not necessarily were associated with the typical increase in root weight or the increased stem length, even though a positive effect can be found in the total fresh weight of the plant. It has been reported (Akram et al., 2015) that *Bacillus fortis* or *B. subtilis* increased the root and shoot biomass of three different varieties (Fine Star, Río Grande, Red Power) of tomato plants, which increased tomato fruit production. The results

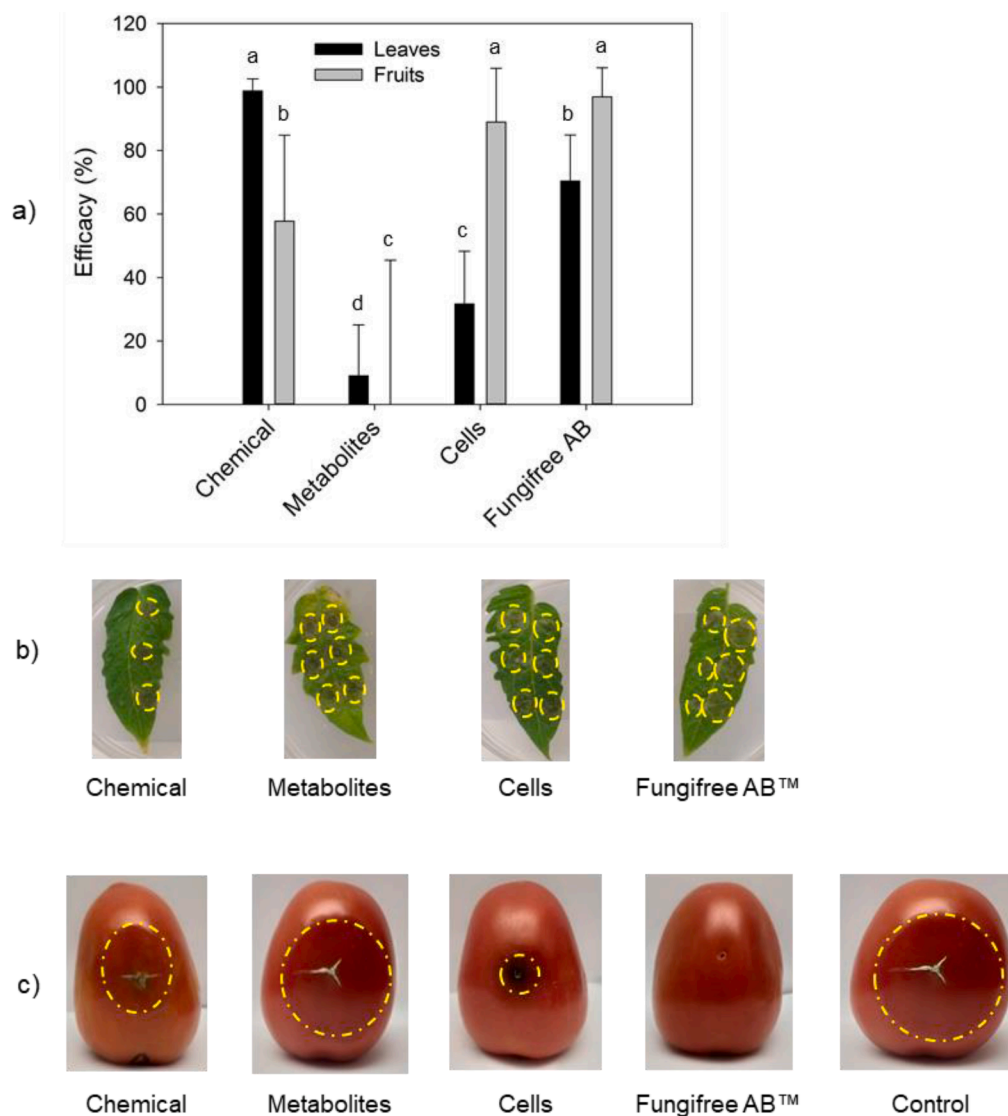
were associated with the production of auxins, siderophore, phosphate solubilization. *B. subtilis* strain inoculated in tomato plants (Pishchik et al., 2018) increased the productivity of tomato variety Licurich and Moldova by 24% and 21%, respectively; the results were associated with the increase in the chlorophyll content in the plant, as well as a higher height and biomass of the plant, which promoted the higher production of fruits/plant and fruits of higher weight. The effect of individual inoculation of *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida*, *B. amyloliquefaciens* or *Bacillus mojavensis* increased the biomass as well as the water content in the root (which favors the mobility of nutrients), which resulted in an increased fruit production of tomato fruits (between 39% and 18% more), with a higher content of macro and micronutrients (He et al., 2019). Therefore, it is likely that *B. velezensis* 83 displayed several growth promotion traits (related to the nutrient uptake) to influence the tomato production and fruit quality.

#### Biological control of *B. velezensis* 83 antagonism factor vs *B. cinerea* in tomato leaves and postharvest fruits

The antimicrobial activity of *Bacillus* spp metabolites has been extensively documented (Borriss, 2016; Fan et al., 2018; Fira, 2018; Keswani et al., 2020; Rabbee et al., 2019; Rabbee and Baek, 2020) and more than a dozen of bioformulations based on *B. amyloliquefaciens* (*B. velezensis*), *B. subtilis*, and *B. pumilus* are currently commercialized (Keswani et al., 2020). *B. velezensis* 83 is commercialized as a bio-fungicide (Fungifree AB™) for biological control of mango anthracnose (Balderas-Ruíz et al., 2020) and it is recommended to use in foliar application. It has been reported (Luna-Bulbarela et al., 2018) that Bacillomycin D (lipopeptide of the iturin family) produced by *Bacillus* sp 83 (now identified as *B. velezensis* 83), in concentrations above 19  $\mu\text{M}$  affects spore germination and mycelial growth (*in vitro* tests) of *C. gloeosporioides* 09. Due to the characteristics of the production process of Fungifree AB™, the formulation contains two antagonism factors that are: spores (which turn to vegetative cells after germination), and metabolites (produced during the cultivation of the bacteria for spore production). Unravel which is the antagonism factor that has the main effect of biological control in the commercial product would allow us to optimize the production process of *B. velezensis* 83 and will be useful for designing biological control strategies. Fig. 6 shows the results of the biological control *in vitro* tests carried out with the different formulations of *B. velezensis* 83 antagonism factors against *B. cinerea* 05 infection in leaves and fruits. The efficacy of control was compared against a chemical control (Chlorotalonil). The highest control efficacy on *B. cinerea* 05 leaves infection was obtained with the chemical treatment (>95%). After this, the best treatment was Fungifree AB™ (>70%) followed by the cells (~32%) and the least effective was the treatment with metabolites (<10%). The treatments containing cells (using Fungifree AB™ or cells-only formulation) were more effective than the treatment with metabolites only. On other hand, a higher control of *B. cinerea* 05 infected fruits was obtained with Fungifree AB™ and cell treatments (between 89% and 97%) and were statistically equal between them, followed by the chemical control (58%) while the metabolites had no control efficacy. In conclusion, in Fungifree AB™, the antagonism factor that showed the more relevant effect against *B. cinerea* 05 in tomato (leaves and fruits) were the cells (likely germinated spores). The high effectivity of fungal control in fruits, opens the possibility for a postharvest use of this biofungicide.

The efficacy of control of the bacterial strains must be demonstrated in the plant system to which it is desired to protect, which can sometimes be complicated due to the lack of reproducibility of field tests. Therefore, the *in vitro* assays using biological tissues or postharvest fruits are used as alternative. In this way, the assays can be carried out in short time and in a reproducible way in contrast to the field tests. It has been shown (Toral et al., 2018) that *B. velezensis* XT1 CECT 8661 decreased the incidence of infection caused by *B. cinerea* in fruits of tomato, strawberry, and grapefruits by 50%, 12% and 100%, respectively. The use of





**Fig. 6.** Effect of the treatment of *B. velezensis* 83 against *B. cinerea* applied preventively in leaves and fruits: a) *B. velezensis* 83 efficacy of control (%) of *B. cinerea* 05 infection, b) aspect of infection in leaves with different treatment and c) aspect of infection in leaves and tomato fruits with different treatment. Different letters mean significant differences according to ANOVA and Tukey  $\alpha = 0.05$ .

vegetative cells of *B. amyloliquefaciens* RS-25 was more effective than the filtered (through 0.22  $\mu\text{m}$  membranes) supernatant or the methanolic extracts (*i.e.* lipopeptides) isolated from the culture supernatant of the strain, to control *B. cinerea* infection in postharvest fruits (Chen et al., 2019). The control efficacy for *B. cinerea* infection in fruits of tomato, strawberry and grapefruits was associated with colonization, lipopeptides production (as surfactin, bacillomycin D and fengicin), as well as enzymes such as cellulase and protease, siderophores, and VOCs *in vitro* produced by *B. amyloliquefaciens* RS-25. Gao et al (2017) reported that *B. velezensis* ZSY-1 produced VOC as Pyrazine (2,5-dimethyl), benzothiazole, 4-chloro-3-methyl and phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), that achieved between 91-100% inhibition against *B. cinerea* using an *in vitro* test. All these works have associated the infection control of *B. cinerea* mainly by the *Bacillus* metabolites; however, these were produced in culture conditions favoring the production of antimicrobial metabolites or with extracts that contain them in a concentrated quantity. In this work, different results of control efficacy of the treatments between leaves and fruits were observed using the antagonism factors contained in the commercial product. It has been observed that the efficacy of the biological treatments with formulations containing *B. velezensis* 83 cells was higher in fruits than in leaves. In both

cases, the formulation containing only metabolites had the least effective control. *B. velezensis* 83 genome contains the genes for antimicrobial metabolites (surfactin, bacillomycin, fengicin, bacillibactin, macro-lactin, bacillaene, difficidin, amylocyclicin) implicated in the biological control of phytopathogens (Balderas-Ruiz et al., 2020). Therefore, in the field it is probable that *B. velezensis* 83 inhibits the growth of fungal phytopathogens exerting different mechanisms of antagonism due to *in situ* antimicrobial compounds production, competition by space and nutrients (biofilm formation) or also ISR (by *i.e.* VOC or surfactin production).

## Conclusion

In this work, *B. velezensis* 83 was applied to the substrate for tomato cultivation to evaluate the plant growth promotion effect of different concentrations of the bacteria in different stages of tomato development. The bacterial inoculation with *B. velezensis* 83 in seed germination stage or seedlings did not have a promotion effect or even had a negative effect over the plant growth, despite the wide range of bacterial concentration that was evaluated. In contrast, in plants grown in greenhouse, although there was no effect on plant growth, an evident stimulating effect over

the quantity and the quality of fruits was observed when *B. velezensis* 83 was applied to the substrate in high concentration. The effect could be associated with several growth promotion traits as plant hormone production, VOC or biofilm formation capacity of *B. velezensis* 83. Overall, the results showed the potential of *B. velezensis* 83 to stimulate tomato production within the range expected for a greenhouse medium technology which is largely used by Mexican tomato producers. Due to the yields and the quality of the fruits obtained, it was estimated that the profitability of the *B. velezensis* 83 treatment applied to the substrate ( $10^8$  UFC/plant) was 2.5 times higher than the control. At the other hand, it has been shown that *B. velezensis* 83 cells (germinated spores) had the highest control efficiency to the infection of *B. cinerea* in leaves and postharvest fruit. Therefore, we conclude that spores are the main antagonism factor contained in the commercial product (Fungifree AB™). The high effectivity of fungal control in riped fruits, opens the possibility for a postharvest use of this biofungicide.

#### Author contributions

**Karina A. Balderas-Ruíz:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Original Draft. **Clara I. Gómez-Guerrero:** Investigation, Formal analysis. **Sergio Aranda-Ocampo:** Conceptualization, Methodology, Visualization. **Antonio M. Juárez:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Visualization and Software. **Edibel Leyva:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Resources and Supervision. **Mauricio A. Trujillo-Roldán:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Supervision. **Norma A. Valdez-Cruz:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Supervision. **Enrique Galindo:** Conceptualization, Supervision, Visualization, Funding acquisition. **Leobardo Serrano-Carreón:** Conceptualization, Visualization, Funding acquisition, Supervision. All authors contributed to the Writing - Review & Editing.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

KAB-R is a doctoral student from “Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas”, at “Universidad Nacional Autónoma de México” (UNAM). We thank to Juan Adame Adame, Ramón González Bernal and Ernesto Salvador Ramírez Lugo for the excellent technical assistance to realize the greenhouse tomato crop. We thank the Institutional Program of the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM: “La producción de biomoléculas de interés biomédico en bacterias y hongos”. We thank Dussthon Llorente (CEO of Instrulite S. A. de C. V.) for his technical support.

#### Funding

This work was financed by the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT 247473). KABR acknowledge CONACYT for the PhD scholarship 361862.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.crmicr.2021.100076](https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076).

#### References

- Akram, W., Anjum, T., Ali, B., 2015. Co-cultivation of tomato with two *Bacillus* strains: effects on growth and yield. *J. Animal Plant Sci.* 25 (6), 1644–1651.
- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., Jacques, P., 2018. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25 (30), 29910–29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29063401.
- Asari, S., Matzén, S., Petersen, M.A., Bejai, S., Meijer, J., 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92 <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070> fiw070-fiw070.
- Asari, S., Tarkovská, D., Rolčák, J., Novák, O., Palmero, D.V., Bejai, S., Meijer, J., 2017. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245, 15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>.
- Balderas-Ruíz, K.A., Bustos, P., Santamaría, R.I., González, V., Cristiano-Fajardo, S.A., Barrera-Ortiz, S., Mezo-Villalobos, M., Aranda-Ocampo, S., Guevara-García, Á.A., Galindo, E., Serrano-Carreón, L., 2020. *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. *AMB Express* 10 (1), 163. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01101-8>.
- Basu, A., Prasad, P., Das, S.N., Kalam, S., Sayyed, R.Z., Reddy, M.S., El Enshasy, H., 2021. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustainability* 13, 1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>.
- Borriess, R., 2016. Phytostimulation and biocontrol by the plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: an update. In: Islam, M., Rahman, M., Pandey, P., Jha, C., Aeron, A. (Eds.), *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_8).
- Chen, X., Wang, Y., Gao, Y., Gao, T., Zhang, D., 2019. Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *Plant Pathol. J.* 35 (5), 425–436. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0064>.
- Chen, L., Wang, X., Ma, Q., Bian, L., Liu, X., Xu, Y., Zhang, H., Shao, J., Liu, Y., 2020. *Bacillus velezensis* CLA178-induced systemic resistance of *Rosa multiflora* against crown gall disease. *Front. Microbiol.* 11, 587667 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587667>.
- Chojnacka, K., 2015. Innovative bio-products for agriculture. *Open Chem.* 13, 932–937.
- Erba, D., Casiraghi, M.C., Ribas-Agustí, A., Cáceres, R., Marfà, O., Castellari, M., 2013. Nutritional value of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in greenhouse by different agronomic techniques. *J. Food Comp. Anal.* 31 (2), 245–251.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H.P., Borriess, R., 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group of *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Front. Microbiol.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>.
- Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X., Wu, L., Wu, H., Gao, X., Borriess, R., 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Front. Microbiol.* 9, 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>.
- FAO, 2019. Crops. On line: 17/04/2021. In <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fira, D., Dimkic, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S., 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>.
- Gao, Z., Zhang, B., Liu, H., Han, J., Zhang, Y., 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biol. Control.* 105, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.007>.
- He, Y., Pantigoso, H., Wu, Z., Vivanco, J., 2019. Co-inoculation of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* at different development stages acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of tomato. *J. Appl. Microbiol.* 127, 196–207. <https://doi.org/10.1111/jam.14273>.
- Hemming, S., Zwart, F.d., Elings, A., Petropoulou, A., Righini, I., 2020. Cherry tomato production in intelligent greenhouses—sensors and AI for control of climate, irrigation, crop yield, and quality. *Sensors* 20, 6430. <https://doi.org/10.3390/s20226430>.
- Hernández-Pacheco, C.E., Orozco-Mosqueda, M.C., Flores, A., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G., 2021. Tissue-specific diversity of bacterial endophytes in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.), and screening for their multiple plant growth-promoting activities. *Curr. Res. Microbiol. Sci.* 2, 100028 <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100028>.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1938. The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* <http://hdl.handle.net/2027/uc2.ark:/13960/t51g1sb8j>.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriess, R., 2007. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20 (6), 619–626. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-6-0619>.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N., Lugtenberg, B., 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19 (3), 250–256. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0250>.
- Keswani, C., Singh, H.B., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y.W., Mezaache-Aichour, S., Glare, T.R., Borriess, R., Sansinenea, E., 2020. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. *App. Microbiol. Biotechnol.* 104 (3), 1013–1034. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10300-8>.

- Khattoon, Z., Huang, S., Rafique, M., Fakhar, A., Kamran, M.A., Santoyo, G., 2020. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. *J. Environ. Manag.* 273, 111118 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N., 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: Maheshwari, DK (Ed.), *Bacteria in Agrobiotechnology: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 37–59.
- Liu, J., Moore, S., Chen, C., Lindsey, K., 2017a. Crosstalk complexities between auxin, cytokinin, and ethylene in Arabidopsis root development: from experiments to systems modeling, and back again. *Mol. Plant* 10 (12), 1480–1496. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.002>.
- Liu, S., Hao, H., Lu, X., Zhao, X., Wang, Y., Zhang, Y., Xie, Z., Wang, R., 2017b. Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7 (1), 10795. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11308-8>.
- Luna-Bulbarello, A., Tinoco-Valencia, R., Corzo, G., Kazuma, K., Konno, K., Galindo, E., Serrano-Carreón, L., 2018. Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biol. Control* 127, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>.
- Mangmang, J.S., Deaker, R., Rogers, G., 2015. Optimal plant growth-promoting concentration of *Azospirillum brasilense* inoculated to cucumber, lettuce and tomato seeds varies between bacterial strains. *Israel J. Plant Sci.* 62 (3), 145–152.
- Miransari, O., Smith, D.L., 2014. Plant hormones and seed germination. *Environ. Exper. Botany* 99, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>.
- Moore, D., Dowhan, D., 2002. Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Curr. Protocols Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0201as59>.
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., Babalola, O.O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>.
- Padmanabhan, P., Cheema, A., Paliyath, G., 2016. *Solanaceous* fruits including tomato, eggplant, and peppers. *Encycl. Food Health* 24–32. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00696-6>.
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P., Macías-Rodríguez, L., 2017. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *Protoplasma* 254, 2201–2213. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1109-9>.
- Pishchik, V.N., Vorobyev, N.I., Ostankova, Y.V., Semenov, A.V., Totolian, A.A., Popov, A. A., Khomyakov, Y.V., Udalova, O.R., Shibanov, D.V., Vertebny, V.E., Dubovitskaya, V.I., Sviridova, O.V., Walsh, O.S., Shafin, S., 2018. Impact of *Bacillus subtilis* on tomato plants growth and some biochemical characteristics under combined application with humic fertilizer. *Int. J. Plant Soil Sci.* 22, 1–12. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2018/41148>.
- Rabbee, M.F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C., Baek, K.H., 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules* 24 (6), 1046. <https://doi.org/10.3390/molecules24061046>. PMID: 30884857; PMCID: PMC6470737.
- Rabbee, M.F., Baek, K.H., 2020. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. *Molecules* 25 (21), 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>. PMID: 33121115; PMCID: PMC7662345.
- RaboResearch. World Vegetable Map 2018. On line: 23/06/2021: <https://research.rabobank.com/publicationservice/download/publication/token/4YFFJRVJFTLbjNUGedUZ>.
- Ramavath, K., Hameeda, B., Reddy, G., 2019. Enhancement of plant growth in tomato by inoculation with plant growth promoting *Bacillus* spp. *World J. Agric. Res.* 7 (2), 69–75.
- Reddy, S., Singh, A.K., Masih, H., Benjamin, J.C., Ojha, S.K., Ramteke, P.W., Singla, A., 2018. Effect of *Azotobacter* sp. and *Azospirillum* sp. on vegetative growth of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Pharmacog. Phytochem.* 7 (4), 2130–2137.
- Ricci, E., Schwinghamer, T., Fan, D., Smith, D.L., Gravel, V., 2019. Growth promotion of greenhouse tomatoes with *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. biofilms and planktonic cells. *App. Soil Ecol.* 138, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.009>.
- SIIN, 2018. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. On line: 25/Junio/2018. [http://www.economia-sniim.gob.mx/Precios\\_de\\_Frutas\\_y\\_Hortalizas.htm](http://www.economia-sniim.gob.mx/Precios_de_Frutas_y_Hortalizas.htm).
- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., Xu, Y., 2013. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *App. Soil Ecol.* 64, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.011>.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I., 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Front. Microbiol.* 9, 1315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>.
- Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Gonzalez-Monterrubio, C.F., Acevedo-Sánchez, E.V., Martínez-Salinas, C., García-Cabrera, R.I., Gamboa-Suasnavart, R.A., Marín-Palacio, L.D., Villegas, J., Blancas-Cabrera, A., 2013. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *App. Microbiol. Biotechnol.* 97 (22), 9665–9674. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5199-9>.
- Tsukanova, K.A., Chebotar, V.K., Meyer, J.J.M., Bibikova, T.N., 2017. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *S. Afr. J. Bot.* 113, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.007>.
- USDA, 2021. Mexico: Tomato Annual (Report MX2021-0030). <https://www.fas.usda.gov/data/mexico-tomato-annual-4>. On line 17/09/21.
- Vaikuntapu, P.R., Dutta, S., Samudrala, R.B., Rao, V.R., Kalam, S., Podile, A.R., 2014. Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. *Indian J. Microbiol.* 54 (4), 403–412. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0470-z>.
- Wagi, S., Ahmed, A., 2019. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ* 7, e7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>.
- Wang, D.C., Jiang, C.H., Zhang, L.N., Chen, L., Zhang, X.Y., Guo, J.H., 2019. Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced drought tolerance in tomato plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (24), 6271. <https://doi.org/10.3390/ijms20246271>.



Contents lists available at ScienceDirect

## Electronic Journal of Biotechnology

journal homepage:



## Research Article

## A case study of a profitable mid-tech greenhouse for the sustainable production of tomato, using a biofertilizer and a biofungicide



Leobardo Serrano-Carreón <sup>a,\*</sup>, Sergio Aranda-Ocampo <sup>b</sup>, Karina A. Balderas-Ruíz <sup>a</sup>, Antonio M. Juárez <sup>c</sup>, Edibel Leyva <sup>d</sup>, Mauricio A. Trujillo-Roldán <sup>e</sup>, Norma A. Valdez-Cruz <sup>e</sup>, Enrique Galindo <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, 62210 Morelos, México

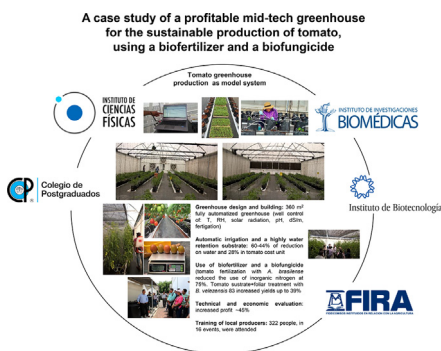
<sup>b</sup> Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

<sup>c</sup> Instituto de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O Box 48-3, 62251 Cuernavaca, Morelos, México

<sup>d</sup> Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura "FIRA", Km. 12.5 Carretera Jiutepec-Zacatepec, Crucero De Tezoyuca, Amatlán, 62765 Emiliano Zapata, Morelos, México

<sup>e</sup> Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510, Ciudad de México, México

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 November 2021

Accepted 17 June 2022

Available online 22 June 2022

## Keywords:

Agriculture

Biocontrol

Biofertilizer

Biofungicide

Greenhouse

Healthy vegetables

Middle-income countries

## ABSTRACT

**Background:** Protected agriculture (PA) is an alternative allowing the control of environmental variables to produce healthy vegetables. Biofertilizers and biofungicides can reduce the chemical load of pesticides. There is abundant literature documenting individual aspects, such as control of environmental variables, irrigation, biological control, and cost assessments. However, there are no reports documenting integral approaches in which variables are considered altogether in a successful case study of mid-tech technology, suitable in middle-income countries like México. We tested if mid-tech greenhouses using biocontrol and biofertilization can increase profits, using tomato as a model system. This work provides considerations about middle-income countries' agriculture and the need for a multidisciplinary approach to offer cost-effective, sustainable alternatives to producers.

**Results:** This technology yielded up to 254 tons/ha-year of tomato, achieving reductions of 44–60% in water consumption, 25% in chemical nitrogen-fertilization, and 28% in the cost unit of production, increasing the profits by ~45% in relation to Mexican conventional greenhouses management.

Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [leobardo.serrano@ibt.unam.mx](mailto:leobardo.serrano@ibt.unam.mx) (L. Serrano-Carreón), [enrique.galindo@ibt.unam.mx](mailto:enrique.galindo@ibt.unam.mx) (E. Galindo).<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.003>

0717-3458/© 2022 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Pesticide reduction  
Protected agriculture  
Sustainable agriculture  
Tomato

**Conclusions:** This case study has shown that it is possible to significantly increase profits in mid-tech greenhouse tomato production by increasing productivity and crop quality and decreasing the use of water and agrochemicals through greenhouse automatization, crop management, and beneficial bacteria applied to crops. **This manuscript includes a video**, supplementary to the main contributions of the project. **Please visit this URL:** <https://youtu.be/uRBGgJqfkLE>.

**How to cite:** Serrano-Carreón L, Aranda-Ocampo S, Balderas-Ruiz KA, et al. A case study of a profitable mid-tech greenhouse for the sustainable production of tomato, using a biofertilizer and a biofungicide. *Electron J Biotechnol* 2022;59. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.003>.

© 2022 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

### 1.1. The need for better and sustainable practices in agriculture

Agriculture is the world's largest industry as it employs more than one billion people worldwide and generates over 1.3 trillion dollars' worth of food annually [1]. The so-called "green revolution" was characterized by intensive agriculture practices in developed countries where the abuse of the use of chemical fertilizers and pesticides, monoculture production, intensive irrigation, and deforestation were regular practices [2]. This approach led to water and soil pollution, pollinators' distress, pest resistance, and human health problems. Irrigation now claims close to 70% of all freshwater appropriated for human use, and a 19% increase in agricultural water consumption is forecasted by 2050. Moreover, to meet food demand by 2050, worldwide production needs to increase by 70% [3]. Monoculture production can cause the accumulation of weeds and promote plant diseases and soil infertility due to a lack of crop rotation practices resulting in loss of soil nutrients and even deforestation [4]. Approximately 30–80% of the nitrogen applied to farmland leach and contaminate water systems which, once into the oceans, cause, among other effects, the seaweed deluge hitting Caribbean shores [2]. Facing an increasing population expected to reach 9.6 billion people by 2050, industrial agriculture systems cannot ensure the availability of healthy and innocuous products to minimize the environmental, health, and social impacts. Therefore, the development of knowledge and techniques to attain sustainable agriculture practices is, in consequence, one of the biggest challenges of the 21st century [5]. One out of 17 Sustainable Development Goals (SDGs) of the 2030 Agenda for Sustainable Development is: "By 2030, to ensure sustainable food production systems and to implement resilient agricultural practices that increase productivity and production. It is also expected that sustainable agriculture practices may help reduce the damage in ecosystems and help maintain food production despite climate change, extreme weather, drought, flooding, and other disasters and that progressively it will improve land and soil quality" [6].

The Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) of México reported in the National Agricultural Survey (Encuesta Nacional Agropecuaria, ENA) of 2017 that 110 millions of hectares (ha) were dedicated to agriculture in México in 2017, 79% of which correspond to irrigated land [7]. Farming land was distributed in 101,828 production units, from which 83% were productive open-air systems. Most of the productive units employed irrigation by gravity (70.8%), chemical fertilization (68.2%), chemical herbicides (66.9%), and pesticides (54.8%). In contrast, only 17,338 production units (17% of the total) corresponded to protected agriculture (PA) systems, most of them greenhouses (54%). Only 30.8% of the PA productive units used fertigation [7]. There is substantial room for improvement of Mexican farm productivity and the introduction of sustainable production systems.

### 1.2. The key aspects for achieving high quality, innocuous and sustainable production while maximizing the return on investment (the case of tomato)

Tomato is currently the most profitable agricultural product that México exports to the USA, accounting for almost 30% of its national production. According to the "Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera" (SIAP) of México the area planted with tomato in México for the agricultural year (AY) 2020 (October 2019–March 2021) was estimated at 45,284 ha, slightly lower compared to AY 2019 (47,372 ha) [8]. To produce this vegetable, different resources are required: water, fertilizers, and pesticides, both of synthetic and organic (or biological) origin; seeds, substrates, energy, plastics, and in the high-end producers, automated sensors and controls that help to achieve an efficient production [9]. The use of each of these resources must be analyzed in relation to its social, economic, and environmental impacts [9,10].

The assessment of these impacts is necessary to promote the adoption of good practices by the producer in PA and agribusiness and minimize the impact on the environment. Moreover, the final product must comply with the quality and innocuity requirements of the final consumer [10]. The current importing policies by regulatory agencies established for food in countries such as México impose reliable evidence that improvements have been achieved in the following aspects [11]:

- Water productivity (more kilograms of tomatoes per cubic meter of water)
- Reduction in the use of synthetic fertilizers and reduction in the chemical load of agro-toxic inputs
- Energy efficiency (more Kg of product per KWh)
- Reduction in carbon footprint
- Use of biodegradable and efficient plastics
- Waste reduction in irrigation supplements, ferrous waste, bags, substrates, disinfectants, packing boxes, among others

### 1.3. Protected agriculture: state of the art and Mexican situation

PA refers to buildings, sensors, actuators, and software that allow controlling the environmental variables and watering of crops to increase their yields, reduce water consumption, and increase profits [12]. Traditionally, this control and monitoring have been achieved using robust and well standardized Programmable Logic Circuits (PLC), local control software, and a limited number of sensors. However, due to its high installation and maintenance costs, its use by farms is limited [13].

The technification of tomato crops in emerging economies, such as México, is diverse. According to the United States Department of Agriculture (USDA), 44,814 planted ha of tomato were reported for AY 2020 [14]; the planted area for tomato production was distributed in open-field (66.19%), greenhouse (16.12%), shade mesh

(16.97%) and tunnel (0.72%) technologies. SIAP reported the yields for tomato production for AY 2020 in open-field was 37 tons/ha-year, greenhouse 185 ton/ha-year, shade mesh 113 ton/ha-year, and tunnel 73 ton/ha-year [8]. These data reflect the impact of tomato production under PA techniques. Nevertheless, the implementation of technology in greenhouses in México as in Latin America is scarce [15,16,17]. This is because the technological transfer between universities and companies is limited, coupled with a poor entrepreneurship culture and the high costs of technification. In this context, a project of medium-tech development such as the one we are presenting here aims to contribute with a system that is both technologically affordable and, at the same time, economically viable for the specific context and needs of producers located in emerging economies such as that of México or Latin America.

1.4. The need of a multidisciplinary approach with cost/benefits considerations

When the multidisciplinary team that carried out the present work was formed, the need for proprietary and original developments was discussed, around the needs of the medium-technical Mexican producers. This was possible due to the plurality of capabilities that this multidisciplinary team possesses in which experts in the areas of agronomy, biotechnology, phytopathology, and process automation were involved (Fig. 1). The participation of FIRA, a financial institution from the Bank of México responsible for technological training and financial services to support Mexican agriculture development, was a critical factor to define technological objectives, economic assessment of the developed technologies, and the possibility of an effective technological transfer. Although there are works dedicated to instrumentation [13,18,19], phytopathological aspects [20,21,22], or biotechnology [23,24,25, 26,27], as far as we know there are no documented experiences of multidisciplinary teams that cover physical, biological, and economic considerations altogether. Furthermore, the evaluation of production costs is rarely considered for projects that involve multiple aspects of crop production and commercialization. We believe that this is a crucial reason which explains why many develop-

ments, although technically robust, do not get to the market for solving concrete problems for the producer. The hypothesis of this work was: “Mid-tech greenhouse incorporating biocontrol and biofertilization increase growers’ profits in middle-income countries as México.”.

2. The model of study and main objectives

2.1. Tomato as an experimental model

Tomato production area under PA has grown from 1,078 hectares in 2006 to 15,006 hectares in 2016, which means an average annual increase of 30%; while tomato production under PA increased from 6.5% to 60.7% of the total [28]. In 2020 México produced 3.3 million metric tons and almost 99.7% of the Mexican exports went to the United States. Of these, 40% of tomato produced was grown in greenhouses with only 16% of the total cultivated area (44,814 ha) and an annual average yield of 180 mt/ha vs 36.8 mt/ha obtained in open-field [14]. Tomato occupies a third of the entire national infrastructure under PA and constitutes a business where small-scale producers participate from less than one to more than 1,000 ha. The profitability of this crop can be measured by some variables that can determine the stagnation, stability, or business success of the participants. These are, among others: a) the size of the production unit, b) the infrastructure and technology used, c) the technological production plans, and d) the market environment. These factors are of particular importance if the producer has a commercial relationship with a market with stringent quality and quantity demands. To meet this demand with competitive production costs, it is necessary to enhance the production yield making use of mid-tech greenhouse infrastructure and environmental and biocontrol techniques.

In the present project, we used a tomato (*Solanum lycopersicum* L.) variety Frodo 1. We used coconut fiber (30% mixed with 70% of porous red volcanic rock) for the watering system to decrease water and fertilizer consumption. Also, to diminish the inorganic nitrogen consumption, we used *Azospirillum brasilense* as nitrogen-fixing bacteria and *Bacillus velezensis* 83 as the biological control agent (BCA) of *Leveillula taurica* (foliar and substrate

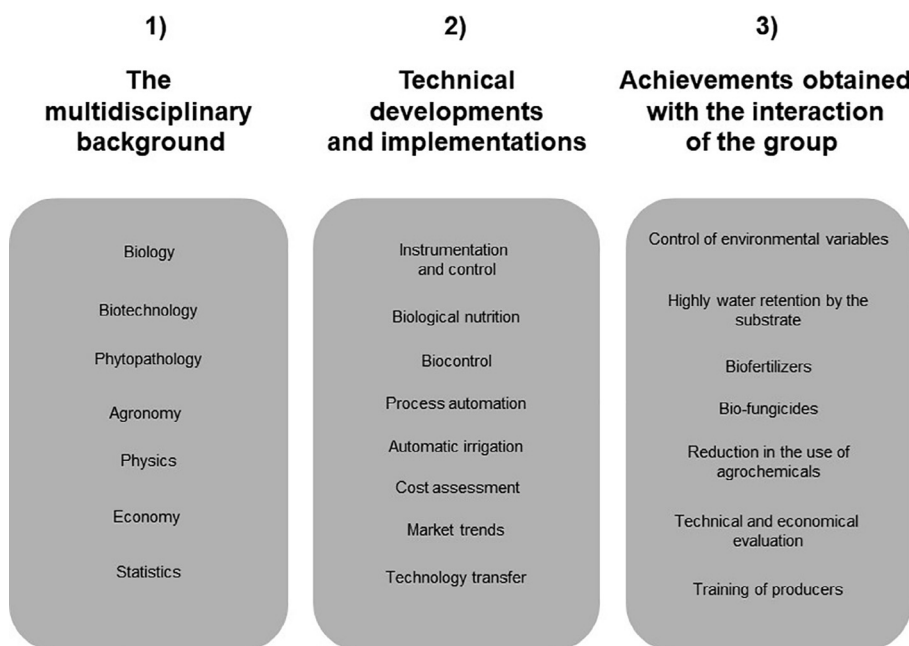


Fig. 1. Scheme of multidisciplinary team approaches and achievements for the technification of intermediate level in tomato crops. 1) The multidisciplinary background; 2) Technical developments and implementations; 3) Achievements obtained with the interaction of the group instrumentation.

applications). The crop was housed in an automated greenhouse with an automatic watering system, shading, and relative humidity monitoring and control.

The Frodo variety is recommended for growing tomatoes for commercial use. It produces medium cylindrical fruit with an intense red color that does not tend to break and, therefore, can be easily transported. Its productive cultivation can be extended for more than six months. This variety is also considered one of the earlier industrial varieties, as it can be harvested as soon as 66–75 d after transplanting the seedlings.

## 2.2. The pathosystem tomato-powdery mildew, biofertilizers and biofungicides

This project aimed to evaluate the yield, quality, and profitability of tomato crops housed in a mid-tech greenhouse production system using reduced amounts of agrochemicals to control fungal diseases. The results were compared to conventional greenhouse technological production management systems, which are highly dependent on agrochemicals. The pathosystem tomato-powdery mildew was selected as a model to evaluate a biofertilizer (*A. brasilense*) and a biofungicide (*B. velezensis* 83) to control this fungal disease. Powdery mildew is caused by various fungal species which affect leaves, stems, flowers, and fruits of Angiosperms; in the world, about 16 genera (900 species) are known [29,30]. *L. taurica* (Lév.) G. Arnaud is a strict parasite endophytic fungus not cultivable on artificial culture medium, the major pathogen of tomato and other Solanaceae, Alliaceae, and Cucurbitaceae plant families [31,32]. *L. taurica* infections in tomato field crops have been reported to cause yield losses of 52% as well as adverse effects on quality fruit [33].

There are no *L. taurica* resistant cultivars available in the market. The control of this pathogen in tomato crops is conventionally carried out by spraying fungicides such as wettable sulfur, myclobutanil, and azoxystrobin [33,34]. *Bacillus* spp. has been applied to tomato plants to stimulate plant growth and control different phytopathogens. As BCA, strains of *B. subtilis* MBI600 and *B. amyloliquefaciens* SQRT3 cause Induced Systemic Resistance (ISR) in tomato plants grown in greenhouse against soil-borne tomato pathogens (as *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*-Forl) and *Ralstonia solanacearum* (tomato bacterial wilt), respectively [35,36]. As for PGPB, the inoculation of *Bacillus fortis* and *Bacillus subtilis* on tomato plants increased the plant's root and shoot biomass and crop productivity [37]. The inoculation of *B. subtilis* in tomato variety Licurich and Moldova also increased tomato productivity [38].

Powdery mildew disease is recurrent in the experimental zone; because of this, *B. velezensis* 83 was applied on the growth substrate and foliar spray. Moreover, to increase productivity in tomato crops and reduce the amount of inorganic nitrogen administered, inoculants of *Azospirillum brasilense* have been used. In fact, inoculation of *Azospirillum* sp. as Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) on tomato varieties reduced transplant stress, increased yields, and diminished chemical fertilizers [39]. The overall aim of this work was to test if a mid-tech greenhouse incorporating biocontrol and biofertilization can increase growers' profits in middle-income countries as México.

## 3. Methodology

The materials and methods of the project were as described with more detail in a previous work [40]. These involved greenhouse technification, environment control, biofertilization, biological control, production, and considering the substrate that improves the decrease in water use. A summary is included in what follows.

### 3.1. Materials

The support germination growing media was a commercial Peat Moss-based medium (Sunshine Mix 3, Sun Gro Horticulture, Agawam, MA). The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seeds var. Frodo (Hybrid Tomato, ITSCO, CdMx, México) were sown in pots. Tomato seeds were germinated in the presence of *A. brasilense* at 18–28°C. For biological control *B. velezensis* 83 (accession number LMG S-30921; Fungifree AB™ obtained from Agro&Biotecnia S. de R.L. de C.V.) was used.

### 3.2. Tomato seed management and treatments with biofertilizer and biological control

Formulations of *B. velezensis* 83 and *A. brasilense* are already available in the Mexican market. Therefore, the *A. brasilense* liquid inoculant was used as a biofertilizer to diminish the nitrogen load and designed to evaluate the effect of nitrogen fixation associated with this product [23]. *A. brasilense* was used during the germination and at the transplantation phases, under a complete nutrition scheme, in which inorganic nitrogen was reduced by 25%. The germination of tomato (Frodo variety) took 21 d when was pre-inoculated with *A. brasilense* (without *A. brasilense* germination took 28 d).

The set of experiments consisted of three production cycles. In each cycle, 14 treatments were evaluated using 34 pots each. The cultivation cycles included between 150 and 160 days, with three harvest months. We used mixed coconut (30%) and porous red volcanic rock (70%) as a highly water-retention substrate. The seedlings were transplanted to 15-liter plastic pots containing the substrate described. Two seedlings were placed per pot, each pot was considered as an experimental unit. Statistical analysis was performed with the average value of production in terms of Kg/pot. The Kg/plant was calculated by dividing the registered value (Kg/pot) by 2. The density of the crop was 2.8 plants/m<sup>2</sup>. Two cycles were supposed to calculate the tons/ha year tomato production. For the statistical analysis of the data, Minitab™ 17 Statistical Software (Minitab, LLC, Pennsylvania, USA) was used. The normality test of the data distribution was performed with the Kolmogorov–Smirnov method ( $\alpha = 0.05$ ) and the test of equality of variances with the Bartlett method ( $\alpha = 0.05$ ). Since the data showed a normal distribution but there was not equality of variances a Welch's test ( $\alpha = 0.05$ ) was performed assuming samples without equal variances, followed by the Games-Howell ( $\alpha = 0.05$ ) as the Post Hoc test.

### 3.3. Mid-Tech systematization and greenhouse startup

Two fully automated greenhouses of 360 m<sup>2</sup> were built at FIRA (Tezoyuca, México). The greenhouses were equipped with a wet wall on the northern side, three exhaust fans on the southern side, active ventilation walls (eastern and western sides), and twelve in-house monitoring points, each equipped with sensors of temperature, relative humidity (RH), solar radiation (environmental parameters) as well as pH, electric conductivity, and moisture of the substrate (fertigation). Since the technological level of the greenhouse development intended for this project corresponded to middle technology, no attempt was made to create a microclimate. These would have taken the project out of the economic constraints that the experts in costs indicated would correspond to the level of technology and resources that were characteristic of the local producers. As such, the controllers installed for shading, wet walls, and extraction fans had the purpose of limiting the temperature changes that are experienced from day to night cycles in the geographic region where the project was implemented. To make a quantitative assessment of this control, it is worth comparing data in the greenhouse, as measured in the range



**Table 1**Nutritional requirements of the tomato crop (*Solanum lycopersicum L.*) in parts per million (ppm) by phenological stage proposed by FIRA staff\*.

Steiner Nutritive solution used by phenological stage (ppm)													
Phenological state	(dS/m)	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Zn	Cu	B	Mo
Transplant	0.5	42	8	68	45	12	28	3	0.5	0.05	0.5	0.025	0.002
Vegetative-Flowering	1.0	84	16	137	90	24	56						
Flowering – start of fruiting	1.5	126	23	205	135	36	84						
	2.0	168	31	273	180	48	112						
fruiting – 1 <sup>st</sup> harvest	2.5	210	39	341	225	60	140						
Harvest	3.0	252	47	410	270	72	168						

(dS/m): electrical conductivity (decisiemens per meter).

\*Taken from reference [40].

from 2016 to 2017 with averages provided by a Weather station of the Mexican Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) [41]. We registered a range of temperatures from 18.8 to 36°C in August of 2016 and between 14 and 34°C in August 2017. The closest weather station (Alpuyeca, México) reports an average in that region ranging from a minimum of 9°C to a maximum of 40°C in the same month. Although the control was moderate, it was enough to keep the growing of tomatoes within a climate envelope that reduced temperature and humidity stress that leads to disease when extremes are reached.

An independent automated irrigation system per line of pots was designed. The irrigation system acted depending on the soil variables to be controlled (pH, osmolarity, and programmed nutrition). The environmental variable monitoring system consisted of twelve monitoring points to measure the temperature, irradiation, and RH. Each monitoring box transmitted the readings to a central panel to calculate the readings' averages and take the required control action.

### 3.4. Fertigation system

The fertigation inputs were decided to be pH 6.3–6.4 and output pH 7.5–8.1, and the electrical conductivity between 0.5 and 2.0 dS/m

according to the plants' phenological stage and the recommendation of FIRA staff. In some lines, the fertigation system was designed to supply 50% of the nitrogen load to a set of pots, another set with 75% nitrogen, and the rest with the conventional nutritional load. In Table 1 (reproduced from reference [40]) are shown the nutritional requirements of the tomato crop (*Solanum lycopersicum L.*) in parts per million (ppm) by phenological stage proposed by FIRA staff.

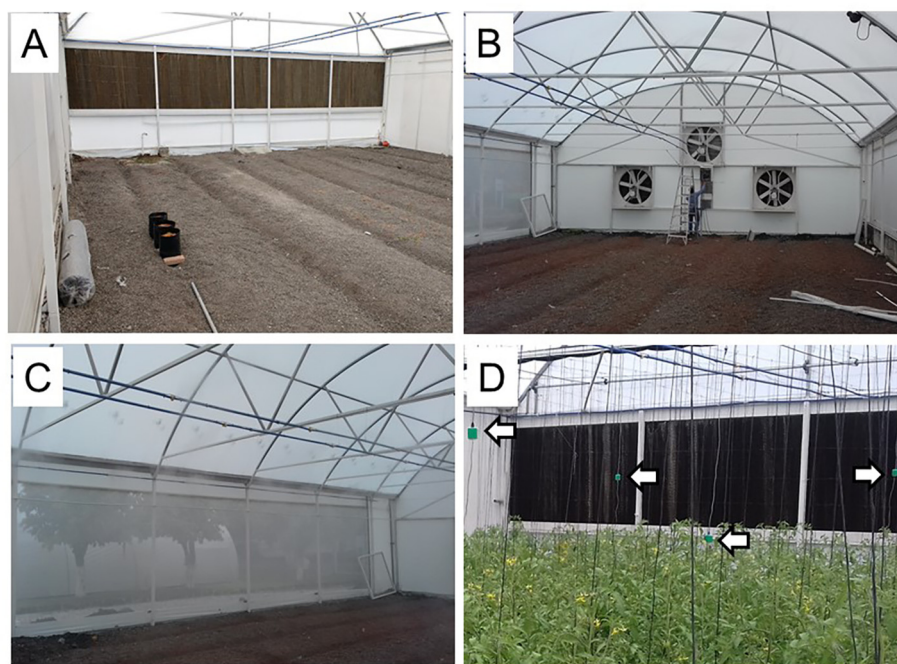
### 3.5. Infection of tomato plants by *L. taurica*

We promoted the infection of tomato plants in the greenhouse. Tomato plants infected with *L. taurica* were placed as inoculum sources inside the greenhouse.

## 4. The development of the project

### 4.1. Design, construction, implementation, and improvement of the greenhouse instrumentation

During the project's first year, the first main objective was to construct and automate a 360 m<sup>2</sup> arched greenhouse at FIRA (Tezoyuca, México). In 2017, a second 360 m<sup>2</sup> fully automatized greenhouse was built, with the exact technical specifications of the first greenhouse. The greenhouses were equipped with a wet



**Fig. 2.** Construction and automatization of a 360 m<sup>2</sup> arched PVC greenhouse at FIRA (Tezoyuca, México). The greenhouse was equipped with a wet wall on the northern side (A), three exhaust fans on the southern side (B), and active exterior roll walls (over the mesh walls) on the eastern and western sides (C). Twelve environmental monitoring points (temperature, relative humidity, and solar radiation, shown by arrows) were used (D). An automated pull wire mechanism of a horizontal screen was placed to decrease the luminosity and spray humidifiers were installed, both on the inside top of the greenhouses. Also, a particular fertigation system was designed to supply 50% of the nitrogen load to a set of pots, another set with 75% nitrogen, and the rest with the conventional nutritional load recommended by the FIRA experts (Table 1).



wall on the northern side, three exhaust fans on the southern side, active ventilation walls (eastern and western sides), and twelve in-house monitoring points, each equipped with sensors of temperature, relative humidity (RH), solar radiation (environmental parameters) as well as pH, electric conductivity, and moisture of the substrate (fertigation) (Fig. 2). Variables' acquisition was programmed at 15 min intervals, and control of the variables was performed through Proportional-integral-derivative retrofitting algorithms. The validation of the system was carried out in parallel with the experimentation. Some operational and technical problems were raised, and they had to be solved during experimentation. It is important to point out that the time required to validate the instrumentation and the control of the greenhouse must be planned before the operation.

The instrumentation was divided into a subsystem on environmental monitoring (RH, temperature, and solar irradiation), a web-server subsystem (capable of monitoring and sending information remotely, developed in Java), and a subsystem of control that action the wet wall in the northern side, spray humidifiers on the roof, up to three exhaust fans at the southern side, active ventilation walls on eastern and western sides and open/close the automated shading (to control the environmental parameters). We also designed an independent subsystem for automatic irrigation, which acted depending on the soil variables to be controlled (pH, osmolarity, and programmed nutrition).

The environmental variable monitoring system was designed and built consisting of twelve monitoring points with four sensors each, which measured temperature, irradiation, and air RH. Each monitoring box transmitted the readings to a central panel to calculate the readings' averages and take the required control action. A day/night cyclical tendency of the temperature, RH and luminosity data was expected, and the control was programmed to avoid abrupt departures on extremely hot or cold days. Thus, it was possible to maintain statistically similar intervals during seasonal changes. The environmental conditions to produce tomatoes were between 14 and 34°C, RH in the range of 28–85%, and maximum light near 3,300 footcandles ( $\sim 35,000$  lux) (Fig. 3), following also the FIRA staff recommendations. Overall, the control systems allowed for maintaining the greenhouse within the above-mentioned recommended intervals.

#### 4.2. Design and evaluation of the fertigation system

A particular fertigation system was designed to supply 50% of the nitrogen load to a set of pots, another set with 75% nitrogen, and the rest with the conventional nutritional load recommended by the FIRA experts (Table 1). The nitrogen load reduction was designed to evaluate the effect of nitrogen fixation associated with the liquid inoculant formulation of the *A. brasilense* [23]. It has been reported that the reduction in inorganic nitrogen in the formulation of fertigation improves the fixation capacity of *Azospirillum* in crops [25,42]. The fertigation inputs were decided to be pH 6.3–6.4 and output pH 7.5–8.1, and the electrical conductivity between 0.5 and 2.0 dS/m according to the plants' phenological stage and the recommendation FIRA staff. The cultivation cycles were between 150 and 160 days in this production system, with three harvest months. The use of coconut fiber, in combination with the monitoring of the conductivity in the substrate, allowed to reduce water consumption (among 44–60%) from 60 L of water per plant using 100% porous red volcanic rock to 34 L of water per plant using the mixed coconut (30%) and porous red volcanic rock (70%) as substrate in 15 L plastic pots. A reduction of  $\sim 28\%$  in the tomato cost unit of production was achieved.

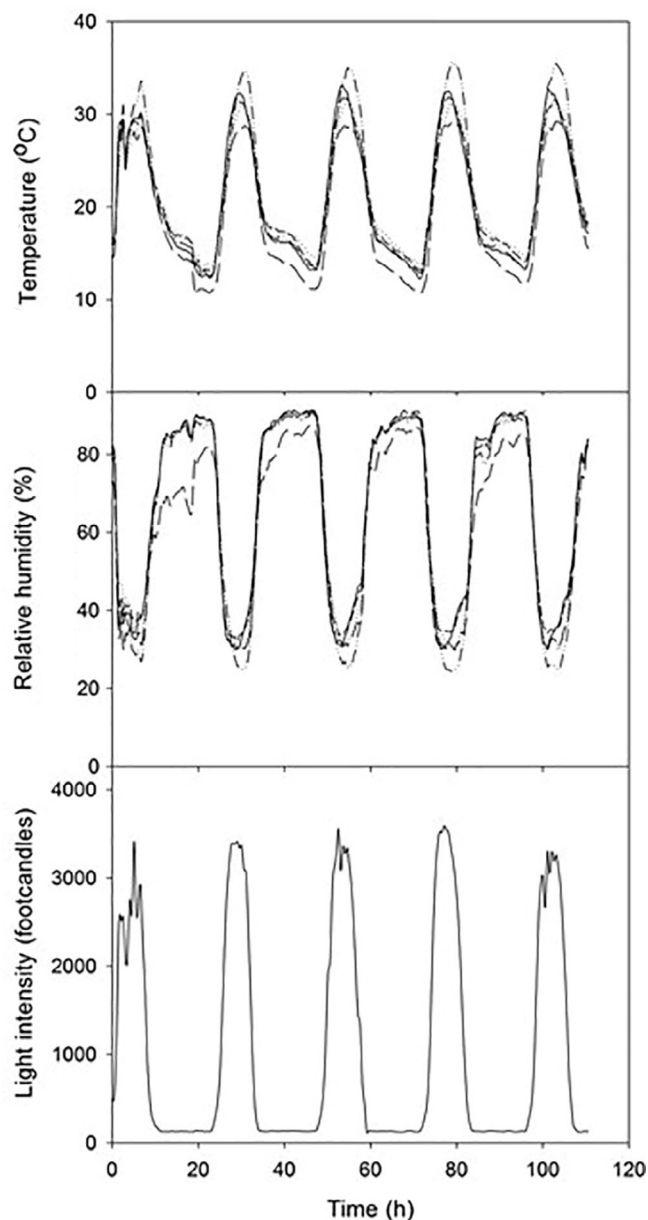


Fig. 3. As expected, a day/night cyclical tendency of the temperature, humidity, and luminosity data was obtained. The controllability was programmed to avoid abrupt departures on extremely hot or cold days. The controlled greenhouse was between 14 and 34°C (five sensors widely distributed), relative humidity between 25% and 85% (five sensors widely distributed), and a maximum light of 3,300 footcandles (the sensors were located inside the greenhouse, below the automated pull wire mechanism of the horizontal screen). The temperature and humidity sensor that deviates from the other four is the one that is close to the exhaust fans.

#### 4.3. Design, implementation, and results of the experimental system

The experiments were designed to integrate and economically evaluate existing technologies to produce tomato variety (Frodo 1, Maviri). It is important to point out that formulations of *B. velezensis* 83 and *A. brasilense* are already available in the Mexican market. *B. velezensis* 83 is commercialized under the label of Fungi-free AB™, a biofungicide effective against several fungal plant pathogens (*L. taurica*, among others) attacking more than 20 different crops [40,43]. A liquid formulation containing two combined *A.*

*brasilense* strains (Maxifer™) was used as a nitrogen fixation inoculant, successfully used for biofertilization of several crops in México [23]. We initially carried out two production cycles, and twenty-two treatments were evaluated (480 pots), where production from eight to twelve tomato harvests in each cycle was evaluated. Unfortunately, high variability within treatments avoided obtaining conclusive results. Indeed, 20 pots per treatment were not enough to get significant differences between treatments which were one of the main lessons obtained from this first set of experiments. Farmers frequently rely on total productivity to evaluate new products or technologies as the leading indicator. This is probably an adequate parameter when large experimental set-ups are available, but not in the case where only a few experimental units are available. Considering this first set of experiments, two additional production cycles were done, and reliable results were obtained. In each cycle, 14 treatments (34 pots each) were evaluated. *A. brasilense* was used at the germination and at the transplantation phases under a complete nutrition scheme, in which inorganic nitrogen was reduced by 25%.

#### 4.4. Biological control of *L. taurica*

In the project, we promoted the infection of tomato plants in the greenhouse. Tomato plants infected with *L. taurica* were placed as inoculum sources inside the greenhouse, achieving infection two days after their introduction. Nevertheless, the incidence of powdery mildew was highly variable, and the experiment was not reproducible. No powdery mildew was detected in our conditions in any treatment (chemical or biological). So, it was not possible to evaluate the biological control of *L. taurica* by *B. velezensis* 83. However, the results showed that the use *A. brasilense* and *B. velezensis* 83 had a positive effect on total yield (~39% higher) and fruit quality (~55% more production of first quality) of tomato. In our experience, using this biofertilizer and biofungicide on tomato greenhouse production systems may be a viable alternative to obtain a higher yield and quality of tomato fruit without spraying synthetic fungicides to control powdery mildew. Our findings may be significant for some regions of México, where traditionally 13–18 applications of fungicides are made to prevent or control powdery mildew in intensive production systems in undetermined growth tomato varieties [34].

#### 4.5. Tomato growth evaluations using biological treatments

The most relevant results of the last two consecutive tomato production cycles are reported here since the treatments included in the experimental design were refined according to each cycle experimented. The germination of tomato (Frodo variety) took 21 days and was pre-inoculated with *A. brasilense* (without *A. brasilense*, germination took 28 d). The seedlings were transplanted into 15 L plastic pots. Two seedlings were placed per pot, and the density of the crop was 2.8 plants/m<sup>2</sup>.

For biological treatments, the commercial product Fungifree AB™ was used to evaluate the effect on the growth and yield of

the tomato plants when applying *B. velezensis* 83 on the foliage as biofungicide and to the substrate as plant growth-promoting bacteria. Three biological treatments and non-inoculated plants control were evaluated. For each treatment with Fungifree AB™, ten applications were done to the foliage and six to the substrate. To evaluate the effect of the treatments on the quality, the harvested fruits were classified according to their weight in first ( $\geq 100$  g/fruit), second ( $\leq 99$ –60 g/fruit), and third ( $\leq 59$  g/fruit) quality.

In terms of plant growth, there were no significant differences between the treatments evaluated and the control. It was also found that there were no significant differences in tomato production when the plants received *Bv* 83 foliar or *Bv* 83 foliar + substrate low treatment with respect to control plants (3.3 Kg/plant), since these plants produced 3.5 and 3.8 Kg/plant, respectively. In contrast, in the *Bv* 83 foliar + substrate high treatment the plants produced 4.5 Kg/plant (Table 2). The estimated tomato yield with the *Bv* 83 foliar + substrate high treatment was 254 ton/ha-year, which represented almost 43% more than the average yield of a crop in greenhouse agriculture technology in México, which between 2007 and 2017 was of ~177 ton/ha-year [28]. Under the conditions in which tomato cultivation was developed in the greenhouse, this treatment increased the total tomato yield by 19% of first quality tomato, in contrast, to control plants (184 ton/ha-year). It is known that production yield always varies depending on the technologies used, from open-field cultivation to production in highly instrumented greenhouses with automated irrigation, nutrition, and phytosanitary control systems. As a referent, in México it is considered that the tomato yield production in low-tech greenhouses has yields of 120 ton/ha-year, in medium technology from 200 to 250 ton/ha, and in the high technology up to 600 ton/ha [28].

#### 4.6. Economic analysis

For profitability estimation, the unit cost of production (UCP) of the greenhouse-grown tomato was calculated considering the average tomato yield (ton/ha-year) estimated in each case (Table 2 and Table 3). The cost of production involves the variable and the fixed costs. The variable costs were constituted by the cost of inputs (seed, agrochemicals, fertilization) and the direct labor cost. The fixed expenses were included by the price of accessories and tools for cultural activities, services (greenhouse rent, amortization of fixed initial investment), and technical assistance for tomato crop management. The cost of the fixed initial investment included the price of a plastic wall, irrigation equipment, and the structure of the greenhouse, the total capital needed was estimated at USD 125,000.00. The amortization was calculated considering a financing interest of 12%, paid for ten years. A sale price of 0.5 USD/Kg was considered [44]. The treatment with the highest profitability was the *Bv* 83 foliar + substrate high, while the one with the lowest profitability was the control (Table 3). The technical-economic study of the treatments showed that the UCP was 38% higher in control plants compared to the best biological treatment applied. Due to the higher yields obtained with the *Bv* 83 foliar + substrate

**Table 2**  
Greenhouse tomato production with different *B. velezensis* 83 biological treatment.

Treatment	Tomato		
	Kg/plant ( $\pm$ SD)	Kg/m <sup>2</sup> /cycle	Ton/ha-year
<i>Bv</i> 83 foliar ( $6.7 \times 10^7 < 1.3 \times 10^8$ CFU/plant)	3.5 <sup>b</sup> ( $\pm 0.9$ )	9.8	196.5
<i>Bv</i> 83 foliar + substrate low ( $6.7 \times 10^7 < 1.3 \times 10^8$ CFU/plant + $1 \times 10^6$ CFU/plant)	3.8 <sup>b</sup> ( $\pm 0.9$ )	10.5	210.6
<i>Bv</i> 83 foliar + substrate high ( $6.7 \times 10^7 < 1.3 \times 10^8$ CFU/plant + $1 \times 10^8$ CFU/plant)	4.5 <sup>a</sup> ( $\pm 1.4$ )	12.7	254.4
Control (non-inoculated plants)	3.3 <sup>b</sup> ( $\pm 0.8$ )	9.1	183.6

Different letters mean significant differences according to Welch's ( $\alpha = 0.05$ ) and Games-Howell ( $\alpha = 0.05$ ) test.

**Table 3**  
Profitability of greenhouse tomato grown with different *B. velezensis* 83 biological treatments.

Treatments	Bv 83 foliar	Bv 83 foliar + substrate low	Bv 83 foliar + substrate high	Control (non-inoculated)
<b>Tomato (Kg/plant)</b>	<b>3.5<sup>b</sup></b>	<b>3.7<sup>b</sup></b>	<b>4.5<sup>a</sup></b>	<b>3.3<sup>b</sup></b>
<b>UCP (USD/Kg of tomato)</b>	<b>0.33</b>	<b>0.37</b>	<b>0.30</b>	<b>0.42</b>
<b>VARIABLE COSTS</b>	<b>0.1881</b>	<b>0.2349</b>	<b>0.1995</b>	<b>0.2640</b>
<b>SEED (Tomate saladette)</b>	<b>0.0310</b>	<b>0.0289</b>	<b>0.0240</b>	<b>0.0332</b>
<b>AGROCHEMICALS</b>	<b>0.0388</b>	<b>0.0363</b>	<b>0.0350</b>	<b>0.0363</b>
<b>Insecticide</b>	<b>0.0049</b>	<b>0.0045</b>	<b>0.0038</b>	<b>0.0052</b>
Conventional	0.0043	0.0040	0.0033	0.0046
Neonicotinoides	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003
Pyriproxyfen	0.0015	0.0014	0.0012	0.0016
Flupyradifurone	0.0025	0.0023	0.0019	0.0027
Organic	0.0006	0.0005	0.0004	0.0006
Soybean oil	0.0004	0.0003	0.0003	0.0004
Argemone and berberine extracts	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Soap	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<b>Fungicide</b>	<b>0.0057</b>	<b>0.0053</b>	<b>0.0095</b>	<b>0.0009</b>
Conventional	0.0002	0.0002	0.0001	0.0009
Carbamates (Previcur energy™)	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002
Sulfur (Velsul 725™)	-	-	-	0.0007
Biological	0.0055	0.0052	0.0093	-
<i>B. velezensis</i> 83	0.0055	0.0052	0.0093	-
(Fungifree A&B™)				
<b>Bactericide</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0003</b>
Conventional	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003
Quaternary ammonium salts	0.0003	0.0003	0.0002	0.0003
<b>Biostimulant</b>	<b>0.0197</b>	<b>0.0184</b>	<b>0.0152</b>	<b>0.0211</b>
Root	0.0021	0.0019	0.0016	0.0022
1-Naphthylacetic acid (ANA)	0.0006	0.0006	0.0005	0.0006
+ Indole 3-butyric acid (IBA)				
Cytokinins + Auxins	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
Indolebutyric Acid	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003
N-P-K + Amino acids	0.0004	0.0004	0.0003	0.0005
Trace elements	0.0005	0.0005	0.0004	0.0006
Foliage	0.0037	0.0034	0.0028	0.0039
N-P-K (20–30–10)	0.0008	0.0007	0.0006	0.0008
N-K-C org	0.0013	0.0012	0.0010	0.0014
N-K-C org + Fe	0.0014	0.0013	0.0011	0.0015
B + Cu + Fe	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Chelating agents	0.0002	0.0001	0.0001	0.0002
Fruit	0.0140	0.0130	0.0108	0.0150
Ca + B + amino acids	0.0007	0.0006	0.0005	0.0007
Calcium	0.0003	0.0002	0.0002	0.0003
Free amino acids	0.0018	0.0016	0.0014	0.0019
Boron	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
N-P-K (5–15–45)	0.0007	0.0006	0.0005	0.0007
Cyt + Gibb + Aux + Vitamins	0.0040	0.0037	0.0031	0.0043
Cytokinins	0.0065	0.0061	0.0051	0.0070
<b>Nutrients assimilation</b>	<b>0.0038</b>	<b>0.0035</b>	<b>0.0029</b>	<b>0.0040</b>
Organic complexes	0.0038	0.0035	0.0029	0.0040
Fulvic acid	0.0038	0.0035	0.0029	0.0040
<b>Acidifyant</b>	<b>0.0045</b>	<b>0.0042</b>	<b>0.0035</b>	<b>0.0048</b>
Inorganic acid	0.0045	0.0042	0.0035	0.0048
<b>FERTILIZATION</b>	<b>0.1116</b>	<b>0.1042</b>	<b>0.0862</b>	<b>0.1195</b>
<b>Conventional</b>	<b>0.1116</b>	<b>0.1042</b>	<b>0.0862</b>	<b>0.1195</b>
Nitrogenous	0.0538	0.0502	0.0416	0.0576
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.0216	0.0201	0.0167	0.0231
KNO <sub>3</sub>	0.0323	0.0301	0.0249	0.0346
Phosphate	0.0123	0.0114	0.0095	0.0131
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0123	0.0114	0.0095	0.0131
Potassium	0.0060	0.0056	0.0046	0.0064
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0060	0.0056	0.0046	0.0064
Complexes	0.0113	0.0106	0.0088	0.0121
Trace elements	0.0113	0.0106	0.0088	0.0121
Other compounds	0.0282	0.0263	0.0218	0.0302
MgSO <sub>4</sub>	0.0043	0.0040	0.0033	0.0046
Fe	0.0091	0.0085	0.0071	0.0098
B	0.0011	0.0011	0.0009	0.0012
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0.0131	0.0123	0.0101	0.0141
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0005	0.0004	0.0004	0.0005
<b>Other</b>	<b>0.0006</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0004</b>
Pest monitoring material	0.0004	0.0004	0.0003	0.0003
Plastic glue	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Chromatic traps	0.0004	0.0003	0.0003	0.0003
Combustible	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

Table 3 (continued)

Treatments	Bv 83 foliar	Bv 83 foliar + substrate low	Bv 83 foliar + substrate high	Control (non-inoculated)
Gasolin	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Gasolin additive	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>LABOR</b>	<b>0.0061</b>	<b>0.0650</b>	<b>0.0538</b>	<b>0.0746</b>
Laborer	0.0061	0.0650	0.0538	0.0746
<b>FIXED COSTS</b>	<b>0.1440</b>	<b>0.1344</b>	<b>0.1036</b>	<b>0.1543</b>
<b>ACCESSORIES AND TOOLS</b>	<b>0.0228</b>	<b>0.0213</b>	<b>0.0099</b>	<b>0.0245</b>
Plant tutoring accessories	0.0037	0.0035	0.0029	0.0040
Tomato rings	0.0005	0.0004	0.0004	0.0005
Wire hook	0.0023	0.0021	0.0018	0.0025
Raffia	0.0010	0.0009	0.0008	0.0011
Material for cultural work	0.0004	0.0004	0.0003	0.0004
Pruning tasks	0.0004	0.0004	0.0003	0.0004
Material for harvest	0.0005	0.0004	0.0004	0.0006
Plastic agricultural crates	0.0004	0.0004	0.0003	0.0005
Bucket of water	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Material for monitoring	0.0002	0.0002	-	0.0003
Digital thermo-hygrometer	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Digital pH and conductivity portable meter	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002
Material for measurement	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Graduated cylinder (100 mL)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Plastic measuring beaker (500 mL)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Material for fumigation	0.0008	0.0007	0.0006	0.0008
Manual spray pump	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Motorized spray pump	0.0006	0.0006	0.0005	0.0007
Plant pot	0.0043	0.0040	0.0033	0.0046
Polyethylene black grow bags (40*40)	0.0043	0.0040	0.0033	0.0046
Material for substrate	0.0129	0.0120	0.0025	0.0138
Tezontle	0.0043	0.0040	0.0008	0.0046
Coconut fiber	0.0086	0.0080	0.0017	0.0092
<b>SERVICES</b>	<b>0.1212</b>	<b>0.1131</b>	<b>0.0936</b>	<b>0.1298</b>
Greenhouse rent	0.0025	0.0024	0.0020	0.0027
Amortization of fixed investment	0.1126	0.1050	0.0870	0.1205
Technical assistance	0.0061	0.0057	0.0047	0.0065
<b>SALE PRICE</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.5</b>
Income/sales	98,273.51	105,312	127,208	91,794
Revenue/Ha	33,002	27,541	50,107	14,992
<b>PROFITABILITY (%/Ha)</b>	<b>51%</b>	<b>35%</b>	<b>65%</b>	<b>20%</b>

high treatment, the profitability was 2 times higher than that of the control.

#### 4.7. Critical analysis of the case study

This project started integrating a multidisciplinary team to tackle, in an integral way, an important problem in México: food supply security. One of the main problems we faced was the high biological variability of tomato production, an issue that has been reported previously [45,46]. That forced us to increase the number of replicas in the experiments and thus limiting the number of experiments. Notably, the use of commercial seeds, currently used by producers, allowed us to confront the technology in an actual situation and obtain realistic results. Although to increase the reproducibility, the use of high-quality seeds (phenotypically) can be considered for future works.

The project involved testing two commercial biological products developed by Mexican companies, which have worked closely with research institutions in México. This was a significant contribution because the producers can use products already available in the market, tested, and registered by the Mexican agencies [23,43]. One critical aspect was the initial homemade instruments used to control temperature and moisture since they were not robust enough to resist environmental conditions inside the greenhouse. We had to use commercial instruments to fix this, allowing us to control the main environmental variables properly.

As a result, we received several producers' requests interested in the technologies. We also performed demonstrations to produc-

ers, which concluded that the technology developed can be implemented in modules, depending on their needs and financial/technological capabilities. Even though the greenhouse could be partially instrumented, the automatic irrigation is necessary. Despite the aspects commented (biological variability, reliable instrumentation, large number of tests), we were able to develop a set of technologies that could be named "intermediate technology" that producers can implement and that can represent an increase in profits of 45%, as compared to the conventional greenhouse technology (Fig. 4) [Supplementary video]. In the present work, we reduced the use of agrochemicals (pesticides) and almost 25% of chemical nitrogen-fertilization.

#### 4.8. The lessons of the project

The multidisciplinary challenge, time, and cost constraints had secondary effects from which lessons learned and experienced, mistakes and goals achieved can be deduced. Here are some of these lessons and potential difficulties for multidisciplinary teams in developing innovative systems for agriculture.

Positive experiences:

- A multidisciplinary group allows to define more comprehensive and challenging aims and scopes on a development project as compared to those produced by a single group. In this project, the design criteria of the sensors and control had to meet both the technical requirements and the upper limits in cost, as the project is meant to be economically viable for Mexican producers.





Fig. 4. Summary of the main achievements of multidisciplinary approaches for sustainable agriculture applied to tomato greenhouse production. In the results improvement table summarizing the results, the arrows indicate increase or decrease with respect to control.

- Training producers and forming specialized human resources with a wider view of the problem-solving strategies is one of the significant outputs of a research project when a multidisciplinary team is available.
- On the technical side, the comprehensive data collection, as obtained from the continuous monitoring of the greenhouse, provides data for future evaluation of artificial intelligence models and neural networks since it provides accurate environmental and physiological plant responses to real environmental inputs.
- Due to the presence of Bank of México Staff (FIRA), with expertise in economics and experience with technical transference to farmers, the project was carried out with a philosophy of lean development, low costs, and transfer viability from the beginning, unlike academic projects, which are developed with fewer constraints, making them less practical at the technology transfer stage.

Negative experiences:

- The biological variability of the plants was not considered at the beginning, this led to difficulties in relating the cause-effect of

environmental control and crop production. Hence, choosing seeds with low genetic variability is essential to monitor the effects closely. However, this study exemplifies the reality a producer faces with access to seeds of different qualities.

- The initial implementation of the instrumentation and control software in conjunction with the current biological control and water-saving experiments required time and training. This was also corrected in later stages and included commercial controllers and sensors as a parallel backup that assisted the systems developed by the group.

### 5. Conclusions

The developed technology (including the integral use of environmental control of the greenhouse, fertigation, the use of a highly water-retention substrate, a biofertilizer, and a biofungicide) yielded up to 254 ton/ha-year of tomato (Frodo variety), achieving reductions of 44–60% in water consumption and 28% in the cost unit of production increasing the profits for the producer in about 45% about Mexican conventional greenhouses management. In addition, it was possible to reduce the use of agrochemicals (pesticides) and almost 25% of chemical nitrogen-fertilization.

This case study has shown that it is possible to significantly increase profits in mid-tech greenhouse tomato production in middle-income countries like México by increasing productivity and crop quality and decreasing the use of water and agrochemicals using greenhouse automatization, crop management, and beneficial bacteria applied to the crop.

### Financial support

This work was financed by the “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”, México (CONACYT 247473).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgement

We thank Dusstthon Llorente (CEO of Instrulite S.A. de C.V.) for the technical support.

### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.06.003>.

### References

- [1] World Wild Life (WWF). Impact of sustainable agriculture and farming practices. 2021 [cited 2021 Nov 4]. Available from: <https://www.worldwildlife.org/industries/sustainable-agriculture>.
- [2] Morseletto P. Confronting the nitrogen challenge: Options for governance and target setting. *Global Environ Change* 2019;54:40–9. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.10.010>.
- [3] Wu W, Ma B. Integrated nutrient management (INM) for sustaining crop productivity and reducing environmental impact: A review. *Sci Total Env* 2015;512–513:415–27. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.101>. PMID: 25644838.
- [4] Salameh S, Biswas D. Chapter 2: Organic farming practices: integrated culture versus monoculture. In: Biswas D, editor. *Safety and Practice for Organic Food*. Micallef SA: Academic Press; 2019;23–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812060-6.00002-7>.
- [5] Pigford AAE, Hickey GM, Klerkx L. Beyond agricultural innovation systems? Exploring an agricultural innovation ecosystems approach for niche design and development in sustainability transitions. *Agric Syst* 2018;164:116–21. <https://doi.org/10.1016/j.agsv.2018.04.007>.
- [6] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Sustainable development goals. 2021 [cited 2021 Nov 4]. Available from: <http://www.fao.org/sustainable-development-goals/indicadors/241/en/>.
- [7] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) 2017. Conociendo el campo de México. 2018 [cited 2021 Nov 4]. Available from: [https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2017/doc/ena2017\\_pres.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/ena/2017/doc/ena2017_pres.pdf).
- [8] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Producción agrícola: Cierre de la producción agrícola (1980–2020). 2020 [cited 2021 Nov 4]. Available from: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- [9] Ronga D, Galligani T, Zaccardelli M, et al. Carbon footprint and energetic analysis of tomato production in the organic vs the conventional cropping systems in Southern Italy. *J Clean Prod* 2019;220:836–45. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.111>.
- [10] Hueso-Kortekaas K, Romero JC, González-Felipe R. Energy-Environmental impact assessment of greenhouse grown tomato: a case study in Almería (Spain). *World* 2021;2(3):425–41. <https://doi.org/10.3390/world2030027>.
- [11] Zhang L, Seale JL. The impacts of food safety modernization act on fresh tomato industry: an application of a two-stage geographic import demand system. *Agricultural and Applied Economics Association (AAEA) Agricultural and Applied Economics Association (AAEA) Conferences 2018, Annual Meeting, August 5-7, 2018; Washington, D.C. 2018* [cited 2021 Feb 21]. Available from: <https://doi.org/10.22004/ag.econ.273916>.
- [12] Shamshiri R, Kalantari F, Ting KC, et al. Advances in greenhouse automation and controlled environment agriculture: a transition to plant factories and urban agriculture. *Int J Agric Biol Eng* 2018;11(1):1–22. <https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20181101.3210>.
- [13] Vaca-Vargas SA. Automated greenhouse, instrumentation and fuzzy logic. *Vis Electron* 2020;14(1):119–27. <https://doi.org/10.14483/22484728.15907>.
- [14] United States Department of Agriculture (USDA). Tomato Annual Report. Number: MX2021-0030. 2021 [cited 2021 Nov 4]. Available from: [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Tomato%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_06-01-2021.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Tomato%20Annual_Mexico%20City_Mexico_06-01-2021.pdf).
- [15] Negrete JC. SCADA'S in the automation of agriculture in Mexico, an Overview [cited 2021 Nov 4]. Available from: *Acta Sci Agric* 2018;2(7):105–12. <https://actascientific.com/ASAG/pdf/ASAG-02-0129.pdf>.
- [16] Negrete JC, Kriuskova ER, Canteñs GDJL, et al. Arduino board in the automation of agriculture in Mexico, a review. *Int J Hort* 2018;8(6):52–68.
- [17] Lopez-Ramirez BC, Guzman G, Alhalabi W, et al. On the usage of sorting networks to control greenhouse climatic factors. *Int J Distrib Sens Netw* 2018;14(2). <https://doi.org/10.1177/1550147718756871>.
- [18] Shamshiri R, Ismail WIW. A review of greenhouse climate control and automation systems in tropical regions. *J Agric Sci Apps* 2013;2(3):176–83.
- [19] Hemming S, de Zwart F, Elings A, et al. Cherry tomato production in intelligent greenhouses—sensors and AI for control of climate, irrigation, crop yield, and quality. *Sensors* 2020;20(22):6430. <https://doi.org/10.3390/s20226430>. PMID: 33187119.
- [20] Chalupowicz L, Zellermann EM, Fluegel M, et al. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 2012;102(1):23–31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0135>. PMID: 21879791.
- [21] Sen Y, van der Wolf J, Visser RG, et al. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Dis* 2015;99(1):4–13. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0499-FE>. PMID: 30699746.
- [22] Wang H, Shi Y, Wang D, et al. A biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCD105 used to control tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* Cooke and promote the growth of seedlings. *Int J Mol Sci* 2018;19(5):1371. <https://doi.org/10.3390/ijms19051371>. PMID: 29734678.
- [23] Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA, Gonzalez-Monterrubio CF, et al. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97(22):9665–74. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5199-9>. PMID: 24061414.
- [24] Walia A, Mehta P, Chauhan A, et al. Effect of *Bacillus subtilis* strain CKT1 as inoculum on growth of tomato seedlings under net house conditions. *Proc Natl Acad Sci India Sect B: Biol Sci* 2014;84:145–55. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0189-3>.
- [25] Lira-Saldivar RH, Hernández A, Valdez LA, et al. *Azospirillum brasilense* and *Glomus intraradices* co-inoculation stimulates growth and yield of cherry tomato under shadehouse conditions. *Phyton-Int J Exp Bot* 2014;83(1):133–8. <https://doi.org/10.32604/phyton.2014.83.133>.
- [26] Cabra Cendales T, Rodríguez González CA, Villota Cuásquer CP, et al. *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Acta Biol Colomb* 2017;22(1):37–44. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.57375>.
- [27] Chandrasekaran M, Chun SC, Oh JW, et al. *Bacillus subtilis* CBR05 for tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits in South Korea as a novel plant probiotic bacterium (PPB): implications from total phenolics, flavonoids, and carotenoids content for fruit quality. *Agronomy* 2019;9(12):838. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120838>.
- [28] FIRA, 2019. (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura). Panorama Agroalimentario: Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. Tomate rojo 2019. [cited 2022 June 11]. Available from: <https://www.fira.gob.mx/InfEspDtoXML/abrirArchivo.jsp?abreArc=65310>.
- [29] Braun U, Cook RTA. *Taxonomic manual of Erysiphales (powdery mildews)*. CBS, Utrecht. ISBN: 9789070351892; 2012.
- [30] Takamatsu S. Origin and evolution of the powdery mildews (Ascomycota, Erysiphales). *Mycoscience* 2013;54(1):75–86. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.08.004>.
- [31] Zheng Z, Nonomura T, Appiano M, et al. Loss of function in *Mlo* orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. *PLoS ONE* 2013;8(7):e70723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070723>. PMID: 23923019.
- [32] Mosquera S, Chen L-H, Aegerter B, et al. Cloning of the cytochrome *b* gene from the tomato powdery mildew fungus *Leveillula taurica* reveals high levels of allelic variation and heteroplasmy for the G143A mutation. *Front Microbiol* 2019;10:663. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00663>. PMID: 31024474.
- [33] Aegerter BJ, Stoddard CS, Miyao EM, et al. Impact of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on yield and fruit quality of processing tomatoes in California. *Acta Hort* 2015;1081:153–8. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1081.17>.
- [34] Guzmán-Plazola RA, Fajardo-Franco ML, García-Espinosa R, et al. Desarrollo epidémico de la cenicilla y rendimiento de tres cultivares de tomate en la comarca lagunera, Coahuila, México [cited 2021 Nov 15]. Available from: *Agrociencia* 2011;45(3):363–78. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci.arttext&pid=S1405-31952011000300009&lng=es&tng=es>.
- [35] Li C, Hu W, Pan B, et al. Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain SQRT3-mediated induced systemic resistance controls bacterial wilt of tomato. *Pedosphere* 2017;27(6):1135–46. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60406-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60406-5).
- [36] Samaras A, Roumeliotis E, Ntasiou P, et al. *Bacillus subtilis* MBI600 promotes growth of tomato plants and induces systemic resistance contributing to the control of soilborne pathogens. *Plants* 2021;10(6):1113. <https://doi.org/10.3390/plants10061113>. PMID: 34072940.

- [37] Akram W, Anjum T, Ali B. Co-cultivation of tomato with two *Bacillus* strains: effects on growth and yield. *J Animal & Plant Sci* 2015;25(6):1644–51.
- [38] Pishchik VN, Vorobyev NI, Ostankova YV, et al. Impact of *Bacillus subtilis* on tomato plants growth and some biochemical characteristics under combined application with humic fertilizer. *Int J Plant & Soil Sci* 2018;22(6):1–12. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2018/41148>.
- [39] Pérez-Rodríguez MM, Pontin M, Lipinski V, et al. *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* increase yield and fruit quality of tomato under field conditions. *J Soil Sci Plant Nutr* 2020;20(4):1614–24. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00233-x>.
- [40] Balderas-Ruíz KA, Gómez-Guerrero CI, Trujillo-Roldán MA, et al. *Bacillus velezensis* 83 increases productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.): Pre and postharvest assessment. *Curr Res Microb Sci* 2021;2:100076. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100076> PMID: 34841365
- [41] Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). Servicio Meteorológico Nacional. [cited 2022 May 4]. Available from: <https://smn.conagua.gob.mx/tools/RECURSOS/Max-Extr/00017/00017072.TXT>.
- [42] Costa RRGF, Quirino GDSF, Naves DCDF, et al. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. *Pesqui Agropecu Trop* 2015;45(3):304–11. <https://doi.org/10.1590/1983-40632015v45i3a593>.
- [43] Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, et al. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: a case study. *Electron J of Biotechnol* 2013;16(3):5. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>.
- [44] Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SIIN). Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. 2018 [cited 2018 June 25]. Available from: [http://www.economia-sniim.gob.mx/Precios\\_de\\_Frutas\\_y\\_Hortalizas.htm](http://www.economia-sniim.gob.mx/Precios_de_Frutas_y_Hortalizas.htm).
- [45] Hasan M, Al Bari A, Hossain MA. Genetic variability and traits association analysis of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genotypes for yield and quality attributes. *Uni. J Plant Sci* 2016;4(3):23–34. , <https://doi.org/10.13189/ujps.2016.040301>.
- [46] Fentik DA. Review on genetics and breeding of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Adv Crop Sci Tech* 2017;5(5):306. <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000306>.