






Bacillus y Pseudomonas fluorescentes de la rizosfera de agaves silvestres antagonistas contra bacterias pectinolíticas

Bacillus and fluorescent Pseudomonas from the rhizosphere of wild agaves antagonists against pectinolytic bacteria

Dulce Cecilia García-Martínez¹ ,
 Alfonso Vázquez-López² ,
 Victoria Ayala-Escobar¹ ,
 Cristian Nava-Díaz¹ ,
 Sergio Aranda-Ocampo^{1*} 

¹Postgrado en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. CP. 56230. Texcoco, Estado de México.

²Instituto Politécnico Nacional, CIDIIR Unidad Oaxaca. C. Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán. CP. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

*Autor de correspondencia: saranda@colpos.mx

Artículo científico

Recibido: 30 de octubre 2021

Aceptado: 27 de enero 2022

Como citar: García-Martínez DC, Vázquez-López A, Ayala-Escobar V, Nava-Díaz C, Aranda-Ocampo S (2022) *Bacillus* y *Pseudomonas* fluorescentes de la rizosfera de agaves silvestres antagonistas contra bacterias pectinolíticas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 9(1): e3177. DOI: 10.19136/era.a9n1.3177

RESUMEN. *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* spp. se encuentran entre las bacterias con mayor potencial para el control biológico de enfermedades en plantas. Los objetivos de esta investigación fueron: i) identificar especies de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* de la rizósfera de agaves silvestres antagonistas de bacterias pectinolíticas, y ii) detectar la presencia de genes para la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos (AMPs) en las cepas antagonistas. Se evaluó el índice de eficiencia antagonista (IEA) *in vitro* de 109 cepas de *Pseudomonas* fluorescentes y 119 de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de agaves silvestre contra cinco cepas bacterianas pectinolíticas de los géneros *Pectobacterium* y *Dickeya*. Por PCR, las bacterias antagonistas se identificaron por secuenciación del gen 16S rRNA y se detectaron los genes AMPs: fenD (fengicina), ituC (iturina), srfAA (surfactina), y bmy (bacilomicina) para *Bacillus* spp.; prnD (pirrolnitrina) y phlD (2,4 diacetilfloroglucinol) para *Pseudomonas* fluorescentes con iniciadores específicos. Los resultados del IEA *in vitro* resultó en la selección de 25 cepas antagonistas contra una o más bacterias pectinolíticas. La comparación de las secuencias del gen 16S rRNA identificaron 11 (44%) cepas en el género *Bacillus* y 14 (56%) en *Pseudomonas* con similitud entre el 97 y 100%. Entre las especies de *Bacillus* y *Pseudomonas*, la mayoría albergó entre dos a cuatro genes AMPs. Los genes ituC, srfAA y phlD fueron de mayor frecuencia en todas las cepas antagonistas; en las cepas *Bacillus subtilis* (9B14) y *Pseudomonas fluorescens* (G3, D4 y H6) se detectaron todos los genes evaluados.

Palabras clave: Control biológico, lipopéptidos antimicrobianos, *Pectobacterium*, *Dickeya*.

ABSTRACT. Fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. are among the bacteria with the greatest potential for the biological control of plant diseases. The objectives of this research were: i) to identify fluorescent *Pseudomonas* and *Bacillus* species from the rhizosphere of wild agaves antagonists of pectinolytic bacteria, and ii) to detect the presence of genes for the biosynthesis of antimicrobial lipopeptides (AMPs) in the antagonist strains. The *in vitro* antagonist efficiency index (IEA) of 109 strains of fluorescent *Pseudomonas* and 119 of *Bacillus* spp. isolated from the rhizosphere of wild agaves against five pectinolytic bacterial strains of the genera *Pectobacterium* and *Dickeya* were evaluated. By PCR, antagonistic bacteria were identified by sequencing the 16S rRNA gene and AMPs genes: fenD (fengicin), ituC (iturin), srfAA (surfactin), and bmy (bacillomycin) for *Bacillus* spp., prnD (pyrrolnitrin), and phlD (2,4-diacetylphloroglucinol) for fluorescent *Pseudomonas* were detected with specific primers. The *in vitro* IEA resulted in the selection of 25 antagonist strains against one or more pectinolytic bacteria. Comparison of the 16S rRNA gene sequences identified 11 (44%) strains in the *Bacillus* genus and 14 (56%) in *Pseudomonas* with similarities between 97 and 100%. Among the *Bacillus* and *Pseudomonas* species, most harbored between two to four AMPs genes. The ituC, srfAA, and phlD genes were more frequent in all antagonist strains; all the genes evaluated were detected in the *Bacillus subtilis* (9B14) and *Pseudomonas fluorescens* (G3, D4, and H6) strains.

Key words: Biological control, antimicrobial lipopeptides, *Pectobacterium*, *Dickeya*.

INTRODUCCIÓN

México es centro de origen de la familia de las Agaváceas y se han identificado 288 especies en el género *Agave*; en México se encuentran 125 especies de agaves que representa el 75% del total mundial (Chávez-Parga et al. 2016). Entre estas, se estiman más de 50 especies del género *Agave* que se cultivan con fines comerciales para la producción del mezcal o tobalá (Aguirre y Eguiarte 2013, Torres et al. 2015). El mayor número de magueyes se encuentran en Oaxaca (23%), donde la producción de mezcal es artesanal en su mayor parte, pero actualmente la producción tecnificada está en aumento (Torres et al. 2015, Chávez-Parga et al. 2016).

Las pudriciones causadas por bacterias pueden ser una limitante para la producción de mezcal de calidad. Se han reportado enfermedades de pudriciones blandas en otros agaves, principalmente en *Agave tequilana* (Jiménez et al. 2004, Vega et al. 2013). Recientemente, en el estado de Guerrero, México, Cabrera et al. (2019) identificaron a *Dickeya chrysanthemi* como el agente causal de marchitez y pudrición del cogollo en *Agave cupreata*. Las pudriciones causadas por bacterias se consideran como las enfermedades que más pérdidas ocasionan en los cultivos (Czajkowski et al. 2011, Rivedal et al. 2021); por lo que en agaves silvestres serían de importancia al afectar el vigor de la planta, así como la calidad y cantidad de la producción de piñas (Jiménez et al. 2004). Para el control de las enfermedades en plantas se busca generar estrategias dirigidas a disminuir el uso de bactericidas químicos mediante la aplicación de métodos como el biocontrol con microorganismos (Keswani et al. 2016, Idrissi et al. 2021).

La rizósfera es la porción del suelo que se encuentra influenciado por los exudados de las raíces de las plantas y es un ecosistema dinámico donde interactúan microorganismos que producen una gran variedad de metabolitos útiles para el control biológico de enfermedades (Kiesewalter et al. 2021, Zhu et al. 2022). Diversas especies de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* se reportan para el control biológico de enfermedades por medio de diferentes

mecanismos de acción como la antibiosis, producción de fitohormonas, competencia por nutrientes, colonización de nuevos nichos ecológicos e inducción del sistema de defensa a la planta (Lugtemberg y Kamilova 2009, Sharma et al. 2016, Dimkić et al. 2022). Estas especies también albergan genes para la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos (AMPs) los cuales son esenciales para el biocontrol de diversos fitopatógenos (Yang 2021, Dimkić et al. 2022). La mayor eficiencia de especies de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* como agentes de biocontrol se asocian con el número de genes que albergan para la biosíntesis de los AMPs; para el caso de especies de *Bacillus* son la surfactina (srfAA), iturina (ituC), fengicina (fenD) y bacilomicina (bmy), para el caso de especies de *Pseudomonas* fluorescentes 2,4- diacetilfloroglucinol (phlD) y pirrolnitrina (prnD) con amplio espectro de biocontrol contra diferentes fitopatógenos (Biessy y Fillion 2018, Zhao et al. 2018).

En el estado de Oaxaca, México para la producción de mezcal artesanal se cultivan distintas especies de agave silvestre (Chávez-Parga et al. 2016), pero las investigaciones que se enfocan en el estudio de las poblaciones bacterianas nativas en la rizósfera de estas especies de agave son escasas (Bautista-Cruz et al. 2015). Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: i) identificar especies de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* de la rizósfera de agaves silvestres antagonistas de bacterias pectinolíticas, y ii) detectar la presencia de genes para la biosíntesis de AMPs en las cepas de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* antagonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las 10 muestras de la rizósfera se obtuvieron de cinco poblaciones de especies de agave silvestre distribuidos en dos municipios del estado de Oaxaca (Tabla 1). Las poblaciones se seleccionaron en localidades donde se extraen continuamente agaves silvestres para obtener mezcal de alta calidad. Las muestras de la rizósfera se obtuvieron de plantas sanas de agave de entre 2 y 4 años de edad, las plantas se encontraban contiguas a plantas de agave

Tabla 1. Muestras recolectadas de la rizósfera de agaves silvestres mezcaleros en Oaxaca, México.

ID muestra	Municipio	Latitud N	Longitud O	Especie de agave silvestre	Nombre común
1-AgM		16.7744276	-96.6140701	<i>Agave angustifolia</i>	Espadín
2-AgM		16.7744217	-96.6140812	<i>Agave mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	arroqueño
3-AgM	Sta. Catarina Minas	16.7744199	-96.6140956	<i>Agave rodocantha</i>	mexicano
4-AgM		16.7744244	-96.6140696	<i>Agave karwinskii</i>	tobasiche
5-AgM		16.7743897	-96.6140783	<i>Agave angustifolia</i>	espadín
6-AgM		17.077052	-96.756920	<i>Agave americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	arroqueño
7-AgM	Sola de Vega	17.077768	-96.7569	<i>Agave potatorum</i>	tobalá
8-AgM		17.077797	-96.758046	<i>Agave karwinskii</i>	tobasiche
9-AgM		17.0778596	-96.751542	<i>Agave potatorum</i>	tobalá
10-AgM		17.0778423	-96.758492	<i>Agave potatorum</i>	tobalá

que mostraban síntomas de pudriciones húmedas del cogollo. Las muestras de la raíz se tomaron a distancia de entre 5 y 10 cm del cuello de la planta y a profundidad de entre 30 y 40 cm de tres plantas por cada especie de agave para formar una muestra compuesta de 200 g de raíces y suelo rizosférico.

Aislamiento de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes

Las muestras de raíces se agitaron suavemente a mano hasta mantener el suelo adherido de forma natural a la raíz de la planta (Aranda *et al.* 2011); después, las raíces con suelo rizosférico se cortaron en fragmentos de 1 cm y colocar 1 g de raíz de cada muestra en tubos estériles de polipropileno (50 mL) (PROLAB México) con 9 mL de buffer fosfatos (g L^{-1}): NaCl 8.0, KCl 0.2, Na_2HPO_4 1.44 y KH_2PO_4 0.24, pH 7 (Hoang *et al.* 2019). La mezcla se homogeneizó por agitación a 90 rpm (Labnet ORBIT 1900. USA) durante 30 min; posteriormente se sometió a sonificación (Ultrasonic Cleaners, Branson 8510. USA) por 30 min. De esta suspensión, se realizaron diluciones en serie (10^0 hasta 10^{-4}) y se sembraron 100 μL de cada dilución con tres repeticiones en medio de cultivo B de King suplementado con cicloheximida, ampicilina y cloranfenicol (Landa *et al.* 2006) y luego se incubaron a 28 °C por 72 h. Las colonias fluorescentes se determinaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UV 380 nm). La densidad de *Pseudomonas* fluorescentes se determinó por el método de diluciones en serie y conteo en placa de colonias (Peng *et al.* 2009). Con los datos del número de colonias se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por el método

Tukey ($\alpha = 0.05$), con el programa R versión 3.6.1. La densidad de *Pseudomonas* se reportó en UFC g^{-1} de raíz.

Aislamiento de poblaciones de *Bacillus* spp.

De cada muestra se colocó 1 g de raíz en 20 mL de buffer fosfatos descrito anteriormente y homogeneizó por agitación a 90 rpm durante 30 min; posteriormente, se sometió a sonificación por 30 min. Las muestras se calentaron a 80 °C por 10 min en baño maría. De esta suspensión, se realizaron diluciones en serie (10^0 hasta 10^{-4}) y se sembraron 100 μL de la suspensión con tres repeticiones en placas Petri con medio de cultivo R2A (Difco) e incubó a 28 °C por 24 h. A partir del crecimiento bacteriano, se seleccionaron y aislaron las cepas con las características morfológicas descritos para *Bacillus* por Lu *et al.* (2018). La densidad de *Bacillus* spp. se determinó por el método de diluciones en serie y conteo en placa de colonias (Peng *et al.* 2009). Con los datos del número de colonias se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por el método Tukey ($\alpha = 0.05$), con el programa R versión 3.6.1. La densidad de *Bacillus* spp. se reportó en UFC g^{-1} de raíz.

Antagonismo *in vitro* de bacterias pectinolíticas

Se evaluaron 109 aislados de *Pseudomonas* fluorescentes y 119 de *Bacillus* spp. contra cinco cepas bacterianas pectinolíticas identificadas por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA aisladas de diversos hospedantes en México, incluyendo agave mezcalero: *D. chrysanthemi* (*A. cupreata* y Aloe vera), *Pectobacterium cacticida*, *P. carotovo-*

rum (*Opuntia* sp.) y *P. brasiliense* (*Neoubuxbaumia tetetzo*). Las bacterias de la rizósfera se sembraron en microplacas de 96 pocillos con 200 μL de caldo nutritivo y se incubaron por 48 h a 28°C. El antagonismo se evaluó por cultivo dual *in vitro* en placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) con medio de cultivo Waksman agar (Berg *et al.* 2006). Las cepas pectinolíticas patógenas (n = 5) se inocularon por extensión sobre la superficie del medio de cultivo con 250 μL de una suspensión acuosa con 3×10^8 UFC mL^{-1} ; se establecieron tres repeticiones. Posteriormente, las bacterias de la rizósfera se inocularon con un inoculador multipunto (Boekel[®], microplate replicator 96 puntos). Las placas se incubaron a 28 °C realizando observaciones cada 24 h durante cuatro días y se seleccionaron las cepas bacterianas que mostraron antagonismo (halo de inhibición del crecimiento bacteriano) contra una o más especies de bacterias pectinolíticas evaluadas.

Índice de eficiencia de antagonismo

Las bacterias de la rizósfera que mostraron antagonismo se incubaron a 48 h de crecimiento a 28 °C; posteriormente se inocularon por punción de masa bacteriana en placas inoculadas con las cepas pectinolíticas bajo las mismas condiciones del ensayo anterior. Las placas se incubaron a 28 °C realizando observaciones cada 24 h durante 96 h. El grado de antagonismo *in vitro* se determinó por el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias pectinolíticas alrededor del punto de inoculación para cada cepa antagonista. El ensayo se repitió tres veces. El índice de eficiencia antagonista (IEA) se determinó con el método propuesto por El-Yazeid *et al.* (2007), que consiste en dividir el área del halo producido por el antagonista entre el área del crecimiento de la colonia: $IEA = \frac{\text{Área del halo}}{\text{Área de la colonia}}$ Con los datos de los halos de inhibición (mm) se realizó el análisis de varianza y la comparación de medias por el método Tukey ($\alpha = 0.05$), con el programa R versión 3.6.1.

Identificación molecular de las cepas antagonistas

El ADN genómico de las 25 cepas con el mayor

IEA se obtuvo con el kit comercial Qiagen[®]. La concentración y calidad del ADN se verificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La amplificación del gen 16S rRNA se realizó con las condiciones de PCR y el protocolo descrito por Weisburg *et al.* (1991) con los iniciadores 8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1942R: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3' en un termociclador (C1000 Touch TM Thermal Cyclor). Las bandas de los amplificadores se verificaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) teñido con bromuro de etidio (500 ng mL^{-1}). Los fragmentos amplificados de un peso molecular de 1500 pb se secuenciaron en MacroGen Inc. (Korea). Las secuencias se compararon en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI), empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.* 1990) del NCBI.

Detección de genes para la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos

La amplificación de los genes *fenD* (fengicina), *ituC* (iturina), *srfAA* (surfactina) y *bmy* (bacilomicina) para *Bacillus* spp.; *prnD* (pirrolnitrina), y *phlD* (2,4- diacetilfloroglucinol) para *Pseudomonas* fluorescentes se realizó con los iniciadores descritos en la Tabla 2.

La reacción de PCR para los genes *fenD*, *ituC*, *srfAA* y *bmy* se realizó en un volumen total de 25 μL , con 12.5 μL de Gotaq Green Master[®] (2X), 9.5 μL de agua libre de nucleasas, 0.5 μL de cada iniciador (25 pmol) y 2 μL de ADN. El programa de ciclos térmicos empleado fue de una desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 min, temperatura de anillamiento de 58 °C por 1 min, extensión de 70 °C por 1 min y una extensión final de 70 °C por 5 min. En el caso del gen *bmy* la temperatura de anillamiento fue de 55 °C durante 1 min. Para el caso de los genes *prnD* y *phlD* para *Pseudomonas*, la reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 μL , con 12.5 μL de Gotaq Green Master[®], 9.5 (2X) μL de agua libre de nucleasas, 0.5 μL de cada iniciador (20 pmol - *prnD* y 25 pmol - *phlD*) y 2 μL de ADN. El programa de ciclos térmicos empleado para el gen *prnD* fue de una desnaturalización

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la detección de genes asociados a la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos en *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas.

Iniciador	Lipopéptido antimicrobiano	Secuencia	G+C (%)	Tamaño del producto (pb)
fenDF	Fengicina	5'-GGCCCGTTCTCTAAATCCAT-3'	50.0	269
fenDR		3'-GTCATGCTGACGAGAGCAAA-5'	55.4	
bmyF	Bacilomicina	5'-GAATCCCGTTGTTCTCCAAA-3'	45.0	370
bmyR		3'-GCGGGTATTGAATGCTTGTT-5'	45.0	
ituCF	Iturina	5'-GGCTGCTGCAGATGCTTTAT-3'	50.0	423
ituCR		3'-TCGCAGATAATCGCAGTGAG-5'	50.0	
srfAAF	Surfactina	5'-TCGGGACAGGAAGACATCAT-3'	50.0	370
srfAAR		3'-CCACTCAAACGGATAATCCTGA-5'	45.4	
prnDF	Pyrrrolnitrina	5'-GGGGCGGGCCGTGGTGATGGA-3'	76.1	786
prnDR		3'-YCCCGCSGCTGYCTGGTCTG-5'	76.1	
phIDF	2,4- diacetilfloroglucinol	5'-TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC-3'	60.0	423
phIDR		3'-CCGCGTTGTTCTCGTTCAT-5'	55.0	

inicial de 95 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 2 min, temperatura de anillamiento de 68 °C por 1 min y extensión de 72 °C por 1 min con extensión final de 72 °C por 5 min. Para el caso del gen *phID* una desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 min, temperatura de anillamiento de 60 °C por 1 min con extensión de 72 °C por 1 min y extensión final de 72 °C por 5 min.

RESULTADOS

Aislamiento y densidad de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* fluorescentes

De las 10 muestras de rizósfera se obtuvieron 119 aislados de *Bacillus* y 109 de *Pseudomonas* fluorescentes. Los resultados muestran que, en la rizósfera de agaves silvestres, las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes fueron más abundantes que las de *Bacillus* spp. La mayor densidad de *Pseudomonas* fluorescentes se detectó en la rizósfera de *A. angustifolia* (muestra 1-AgM, Sta. Catarina Minas) con 2.8×10^7 UFC g⁻¹ de raíz y la menor en *A. potato* (9-AgM, Sola de Vega) con 2.2×10^6 UFC g⁻¹ de raíz. Así mismo, las poblaciones de *Bacillus* spp. fueron más abundantes en la rizósfera de *A. potato* (9-AgM, Sola de Vega) con 9.5×10^5 UFC g⁻¹ de raíz y la menor en *A. angustifolia* (muestra 5-AgM, Sta. Catarina Minas) con 2.4×10^5 UFC g⁻¹ de raíz (Figura 1).

Antagonismo *in vitro*

De 119 aislados de *Pseudomonas* fluorescentes y 109 de *Bacillus* spp. contra cinco cepas bacterianas pectinolíticas, el antagonismo *in vitro* seleccionó 11 cepas de *Bacillus* spp. y 14 de *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas contra una o más cepas bacterianas pectinolíticas evaluadas. Los resultados del análisis estadístico del IEA *in vitro* (Tukey, $\alpha = 0.05$) mostraron diferencias ($P = 0.0883$) para ambas poblaciones contra bacterias pectinolíticas aisladas de diferente hospedantes. El mayor grado de antagonismo se observó con las cepas *B. thuringiensis* (2B16), *Pseudomonas* sp. (F3), *P. fluorescens* (C2) a *Dickeya chrysanthemi* (*Agave cupreata*), *B. subtilis* (9B14) y *P. fluorescens* (G3) a *D. chrysanthemi* (*A. vera*); *B. subtilis* (9B14) y *Pseudomonas* sp. (B10) a *P. brasiliense* (*Neubuxbaumia tetezo*); *B. cereus* (1B1) y *Pseudomonas marginalis* (A4) a *P. cacticida* (*Opuntia* sp.); *B. thuringiensis* (2B16) y *P. fluorescens* (G3) a *P. carotovorum* (*Opuntia* sp). Entre estos antagonistas, 55% fueron especies de *Pseudomonas* fluorescentes y 45% de *Bacillus* (Tabla 3).

Identificación molecular de bacterias antagonistas

Por PCR se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1 500 pb. La comparación de las secuencias de la región 16S rRNA de las cepas antagonistas ($n = 25$) aisladas de la rizósfera de agaves silvestres identificaron a 11 (44%) cepas en el género *Bacillus* y 14 (56%) en *Pseudomonas* con

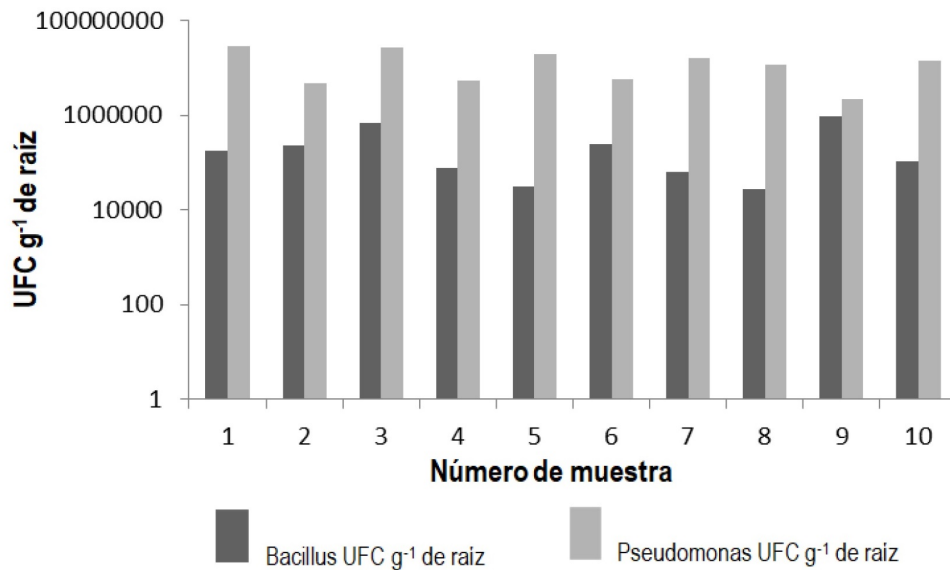


Figura 1. Densidad de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* spp. en la rizósfera de agaves silvestres .

Tabla 3. Índice de eficiencia de antagonismo (IEA) *in vitro* de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. aisladas de la rizósfera de agaves silvestres antagonismo contra bacterias pectinolíticas.

ID cepas	Antagonistas	Bacterias pectinolíticas				
		Pc-T	Dc-S	Pc-O	Pc-N	Dc-A
9B14	<i>Bacillus subtilis</i>	52.66a	22.00a	-	9.16b	-
2B1	<i>Bacillus subtilis</i>	29.33b	9.00b	2.09b	38.20a	-
2B14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3.41b	-	2.25b	-	7.16b
4B18	<i>Bacillus</i> sp.	2.83b	-	2.43b	-	-
1B1	<i>Bacillus cereus</i>	2.25b	-	-	-	-
8B15	<i>Bacillus wiedmannii</i>	-	4.75b	2.25b	-	-
1B8	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	4.0a	5.50b	11.33b
2B16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-	2.20b	2.83b	18.83a
4B6	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	10.08b
2B15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	-	-	-	9.16b
3B17	<i>Bacillus</i> sp.	-	3.46b	-	2.59b	-
C2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4.0b	4.56b	-	7.12a	-
G3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.78b	7.35a	-	3.78b	-
B10	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.10a	4.60b	-	3.77b	-
B12	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	2.16bc	-
D4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.68b	3.01c	-	2.04bc	-
F3	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	2.56c	7.86a	-	6.85a
A4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	4.28b	1.82c	1.61bc	1.56c	4.35b
H6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.37bc	-	3.01b	-	-
H7	<i>Pseudomonas poae</i>	-	-	1.76bc	-	6.09a
G11	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	1.34c	-	2.36c
B8	<i>Pseudomonas</i> sp.	7.12a	-	-	-	2.16c
E9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.16cd	-	-	-	-
B11	<i>Pseudomonas veronni</i>	1.49d	-	-	-	-
H10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	2.36c

Bacterias pectinolíticas: Pb-T (*Pectobacterium brasiliense*-Tetetzto), Dc-S (*Dickeya chrysanthemi*- Sábila), Pc-O (*Pectobacterium carotovorum*- Nopal), Pc-N (*Pectobacterium carotovorum*-Nopal), Dc-A (*Dickeya chrysanthemi*- Agave). (-) no hubo antagonismo . *Promedios con las mismas letras son estadísticamente iguales.

Tabla 4. Identificación molecular por amplificación parcial del gen 16S rRNA de 25 cepas aisladas de la rizósfera de agaves mezcaleros silvestres antagonistas contra bacterias pectinolíticas.

ID cepa	Especie de agave	Identificación	Homología (%)	Número de acceso Genbank	Registro Genbank
9B14	<i>A. potatorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	99	MT605412.1	OL872221
2B1	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	100	MT559808.1	OM101141
2B14	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	KM822602.1	OM101139
4B18	<i>A. karwinskii</i>	<i>Bacillus</i> sp.	99	LC606519.1	OL913788
1B1	<i>A. angustifolia</i>	<i>Bacillus cereus</i>	98	KY616661.1	OL913789
8B15	<i>A. karwinskii</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i>	97	MT378463.1	OL913792
1B8	<i>A. angustifolia</i>	<i>Bacillus cereus</i>	100	KP411923.1	OL913794
2B16	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100	KF054891.1	OM101138
4B6	<i>A. karwinskii</i>	<i>Bacillus</i> sp.	99	MN463013.1	OL913799
2B15	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	KJ572221.1	OM101144
3B17	<i>A. potatorum</i>	<i>Bacillus</i> sp.	100	MZ575129.1	OL913803
C2	<i>A. potatorum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	NR_043420.1	OL913832
G3	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	MT125947.1	OM101132
B10	<i>A. karwinskii</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	KT890311.1	OL913858
B12	<i>A. karwinskii</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	98	KT890304.1	OL913860
D4	<i>A. karwinskii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98	NR_043420.1	OL913867
F3	<i>A. angustifolia</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	HM584787.1	OL913868
A4	<i>A. rodocantha</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	99	NR_027230.1	OM101140
H6	<i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	MT300520.1	OM101134
H7	<i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Pseudomonas poae</i>	99	KT695820.1	OM101133
G11	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	100	JF312981.1	OM101143
B8	<i>A. karwinskii</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	AY091598.2	OL966903
E9	<i>A. angustifolia</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	MG020682.1	OL966929
B11	<i>A. karwinskii</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	100	AB056120.1	OL966933
H10	<i>A. americana</i> var. <i>oaxacensis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98	NR_026078.1	OM101131

un porcentaje de similitud entre el 97 y 100% (Tabla 4).

La secuenciación del gen 16S rRNA mostró que la especie más abundante fue *P. fluorescens* (20%) y *Pseudomonas* sp. (20%), seguidas de *Bacillus* sp. (12%), *B. subtilis* (8%), *B. cereus* (8%), *B. amyloliquefaciens* (8%) y 4% de las especies *B. wedmannii*, *B. thuringiensis*, *P. marginalis*, *P. poae*, *P. veronii* y *P. aeruginosa*.

Detección de genes relacionados a la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos

La presencia de genes para la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos (AMPs) en las cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. antagonistas se evidenciaron por la amplificación de fragmentos óptimos para los diferentes genes evaluados (Figura 2 y Tabla 2). Entre las cepas de *Bacillus* spp., al menos un gen AMPs se detectó en la mayoría de las cepas. La mayoría albergó entre dos a cuatro genes; en la cepa *B. subtilis* (9B14) se detectaron los cuatro genes evaluados. Entre las cepas de *Bacillus* spp. antagonistas la frecuencia de genes

fue *ltuC* (63.63%), *srfAA* (54.54%), *FenD* (45.45%) y *bmy* (18.18%). Así mismo, entre las *Pseudomonas* spp. se detectó al menos un gen en la mayoría de las cepas; las cepas *P. fluorescens* (G3, D4 y H6) albergaron ambos genes evaluados. Entre las especies de *Pseudomonas* antagonistas la frecuencia de genes fue *phlD* (50%) y *PrnD* (42.85%) (Tabla 5).

DISCUSIÓN

Aislamiento y densidad de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* fluorescentes

Especies de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* antagonistas de bacterias pectinolíticas fitopatógenas se aislaron de la rizósfera de cinco especies de agaves mezcaleros silvestres en dos municipios del Estado de Oaxaca. La densidad de las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes fue mayor que las de *Bacillus* spp. La mayor densidad de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus* spp. se observó en *A. angustifolia* (1-AgM) y *A. potatorum* (9-AgM), respectivamente. Al respecto, se sabe que la densidad de poblaciones bacterianas en la rizósfera

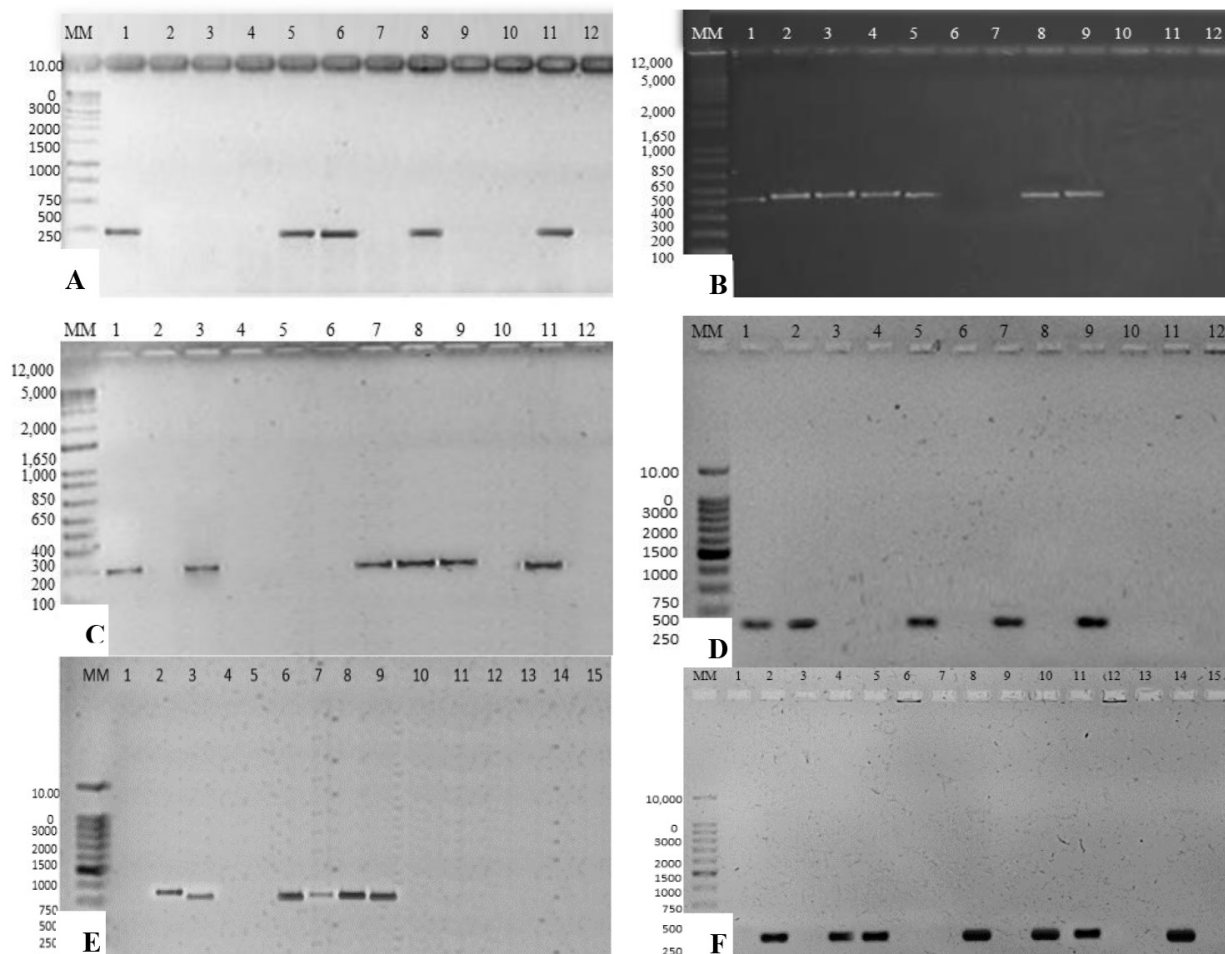


Figura 2. Amplificación de productos de PCR. MM: Marcador de peso molecular 1 kb plus Invitrogen. A) Gen FenD (269 pb). Carriles 1-14 ADN de *Bacillus* spp.; 15: blanco con H₂O. B) Gen ItuC (423 pb). Carriles 1-14 ADN de *Bacillus* spp.; 15: blanco con H₂O. C) Gen srfAA (370 pb). Carriles 1-14 ADN de *Bacillus* spp.; 15: blanco con H₂O. D) Gen bmy (370 pb). Carriles 1-14 ADN de *Bacillus* spp.; 15: blanco con H₂O. E) Gen PrnD (786 pb). Carriles 1-14 ADN de *Pseudomonas* spp.; 15: blanco con H₂O. F) Gen phID (423 pb). Carriles 1-14 ADN de *Pseudomonas* spp. ; 15: blanco con H₂O.

son una subpoblación de la comunidad bacteriana del suelo, que influye en la selección de taxones bacterianos específicos por distintas especies de plantas por medio de los diferentes compuestos de los exudados radicales (Huang *et al.* 2014, Zhu *et al.* 2022). Así mismo, Larsen *et al.* (2015) y Bhattacharyya *et al.* (2022) atribuyeron que la densidad bacteriana en la rizósfera tiene relación importante con los procesos de mineralización del suelo, principalmente con nitrógeno, fósforo y carbono. La mayor densidad de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes en la rizósfera se ha demostrado en otras investigaciones con otras especies de plantas (Chiniqy *et al.*

2021). Otros estudios reportan que la especie de planta y la localización geográfica también influyen en las poblaciones bacterianas (Lugtenberg y Kamilova 2009, Mendes *et al.* 2014, Zarraonaindia *et al.* 2015). Además de que se sabe que en especies silvestres y cultivados del género *Agave*, la composición de las comunidades procarióticas estuvo influenciado principalmente por el exudado de la raíz y especie de agave (Desgarenes *et al.* 2014, Coleman *et al.* 2016), lo cual sugiere que los factores mencionados anteriormente podrían estar influyendo en la densidad de *Pseudomonas* y *Bacillus* spp. encontradas en las especies de agave evaluadas. La especie *B.*

amyloliquefaciens se aisló solo de la rizósfera de *A. americana* var. *oaxacensis* (Tabla 5), lo cual puede evidenciar una relación estrecha con esta especie de agave.

Tabla 5. Cepas de especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* contra bacterias pectinoliticas y detección de genes asociados a la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos.

ID cepa	Identificación	Municipio	Fuente de aislamiento	Antagonismo in vitro						Gen amplificado			PhlD	
				Pb-T	Dc-S	Pc-O	Pc-N	Dc-A	FenD	ItuC	srfAA	Bmy		PrnD
9B14	<i>Bacillus subtilis</i>	Sola de Vega	<i>A. potatorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2B1	<i>Bacillus subtilis</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2B14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B18	<i>Bacillus</i> sp.	Santa Catarina Minas	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1B1	<i>Bacillus cereus</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. angustiloba</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8B15	<i>Bacillus wiedmannii</i>	Sola de Vega	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1B8	<i>Bacillus cereus</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. angustiloba</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2B16	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4B6	<i>Bacillus</i> sp.	Santa Catarina Minas	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2B15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3B17	<i>Bacillus</i> sp.	Santa Catarina Minas	<i>A. potatorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sola de Vega	<i>A. potatorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sola de Vega	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B10	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sola de Vega	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B12	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sola de Vega	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sola de Vega	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F3	<i>Pseudomonas</i> sp.	Santa Catarina Minas	<i>A. angustiloba</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. rodocantha</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sola de Vega	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H7	<i>Pseudomonas poae</i>	Sola de Vega	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G11	<i>Pseudomonas</i> sp.	Santa Catarina Minas	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B8	<i>Pseudomonas</i> sp.	Santa Catarina Minas	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. karwinski</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B11	<i>Pseudomonas veronii</i>	Santa Catarina Minas	<i>A. angustiloba</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sola de Vega	<i>A. mexicana</i> var. <i>oaxacensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Bacterias pectinoliticas: Pb-T (*Pectobacterium brasiliense*-Tetatz), Dc-S (*Dickeya chrysanthemi*-Sábila), Pc-O (*Pectobacterium carotovorum*-N), Pc-N (*Pectobacterium carotovorum*-Nopal), Dc-A (*Dickeya chrysanthemi*- Agave). Péptidos antimicrobianos: FenD (fengicina), ItuC (iturina), srfAA (surfactina), Bmy (bacilomícina), PrnD (pirrolinrina), PhlD (2,4-diacetilfloriglucinolil).

Antagonismo in vitro e identificación molecular de bacterias antagonistas

Pseudomonas fluorescens y *B. subtilis* son las especies antagonistas de *Pectobacterium* y *Dickeya* más abundantes aislados de la rizósfera de distintas especies de agave mezcalero (Tabla 5). El antagonismo eficiente de *B. subtilis* y *P. fluorescens* contra especies de *Pectobacterium* y *Dickeya* se ha demostrado en otras investigaciones con otras especies de plantas (Gerayeli et al. 2018, Salem et al. 2018).

La eficiencia del antagonismo y biocontrol de fitopatógenos entre especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* se ha asociado a la presencia de genes para la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos (AMPs) (Stein et al. 2005, Dimopoulou et al. 2021, Dimkić et al. 2022); la identificación de estos genes en microorganismos antagonistas puede ser una herramienta importante para la óptima selección de agentes de biocontrol de patógenos en plantas (Mora et al. 2011).

Detección de genes relacionados a la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos

Los resultados mostraron diferencias en la distribución, frecuencia y número de genes para la biosíntesis de AMPs entre las cepas antagonistas aisladas de la rizósfera, incluso entre una misma muestra. Este mismo resultado fue reportado por Kiese-walter et al. (2021), quienes encontraron que las cepas de *B. subtilis* aisladas de una misma muestra de suelo fueron diferentes en la frecuencia y número de genes para la biosíntesis de AMPs. Los resultados muestran que en la mayoría de las cepas antagonistas de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. se detectó al menos uno de los genes estudiados; entre las cepas de *Bacillus* spp. los genes de mayor frecuencia fueron ItuC y srfAA por lo que estos resultados coinciden con los reportados por Athukorala et al. (2009) quienes encontraron que los genes para la biosíntesis de surfactina e iturina fueron de mayor prevalencia entre cepas de *Bacillus* spp. En diversas especies de *Bacillus*, la eficiencia del biocontrol de fitopatógenos se ha relacionado con la presencia de algunos de los genes bmyB, fenD, ituC, srfAA para la biosínte-

sis de AMPs (Zhao *et al.* 2018, Cossus *et al.* 2021, Hu *et al.* 2021, Shahid *et al.* 2021). En la cepa *B. subtilis* (9B14) aislada de *A. potatorum* en el Municipio de Sola de Vega, se detectaron los cuatro genes evaluados para la biosíntesis de AMPs. Este resultado es relevante ya que la producción simultánea de AMPs es importante para la eficiencia del biocontrol de enfermedades y resalta el amplio rango de la actividad antagonista en *Bacillus* spp. (Stein *et al.* 2005, Dimkić *et al.* 2022). Aunque la identificación de cepas bacterianas que albergan un alto número de genes para la biosíntesis de AMPs son poco común (Mora *et al.* 2011).

Entre las cepas antagonistas de *Pseudomonas* spp., se detectó el gen *phlD* en la mayoría de ellas. Mientras que las cepas de *P. fluorescens* (G3, D4 y H6) albergaron los genes *phlD* y *prnD* lo que podría indicar un mayor potencial de antagonismo. Al respecto, se sabe que los AMPs 2,4- diacetilfluoroglucinol y pirrolnitrina cumplen una importante función en el biocontrol y en la interacción planta-microorganismo (Landa *et al.* 2006, Dimkić *et al.* 2022, Zhang *et al.* 2021). Las cepas *Bacillus subtilis* (9B14) y *Pseudomonas fluorescens* (G3, D4 y H6) albergan todos los genes para la biosíntesis de AMPs estudiados. Por lo anterior, estas cepas son un recurso biológico valioso que merecen ser estudiados con mayor profundidad como potenciales agentes de

biocontrol contra patógenos bacterianos causantes de pudriciones blandas en agaves u otras aplicaciones biotecnológicas, ya que cepas bacterianas que albergan un mayor número de genes para la biosíntesis de AMPs son más efectivos como agentes de biocontrol contra fitopatógenos (Joshi *et al.* 2006, Cossus *et al.* 2021, Hu *et al.* 2021, Shahid *et al.* 2021).

CONCLUSIONES

En la rizósfera de los agaves silvestres son más abundantes las especies de *Pseudomonas* fluorescentes que las de *Bacillus*. En ambas poblaciones hay antagonistas contra una o más bacterias pectinolíticas fitopatógenas. *B. subtilis* y *P. fluorescens* son las especies más frecuentes con el mayor grado de antagonismo contra bacterias pectinolíticas; estas especies albergan al menos un gen para la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos. Los genes *ltuC* (*ltu*-rina), *srfAA* (Surfactina) y *phlD* (2,4 diacetilfluoroglucinol) son de mayor frecuencia en todas las cepas antagonistas evaluadas, pero las cepas *B. subtilis* (9B14) y *P. fluorescens* (G3, D4 y H6) albergan todos los genes evaluados; por lo que se deben seguir estudiando.

LITERATURA CITADA

- Aguirre D, Eguiarte L (2013) Genetic diversity, conservation and sustainable use of Wilde *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90: 36-44.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Aranda S, Montes-Borrego M, Jiménez-Díaz RM, Landa BB (2011) Microbial communities associated with the root system of wild olives (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*) are good reservoirs of bacteria with antagonistic potential against *Verticillium dahliae*. *Plant Soil* 343: 329-345.
- Athukorala SN, Fernando WG, Rashid KY (2009) Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 1021-32.
- Bautista-Cruz A, Martínez-Gallegos V, Martínez-Martínez L, Martínez-Gutiérrez G (2015) Effect of phosphate solubilizing bacteria on the growth of *Agave angustifolia* Haw. (maguey espadín). *Pakistan Journal of Botany* 47: 1033-1038.

- Bhattacharyya C, Imchen M, Mukherjee T, Haldar S, Mondal S, Mukherji S, Haldar A, Kumavath R, Ghosh A (2022) Rhizosphere impact bacterial community structure in the tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze.) estates of Darjeeling, India. *Environmental Microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.15874.
- Berg G, Opelt K, Zachow C, Lottmann J, Götz M, Costa R, Smalla K (2006) The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 250-261.
- Biessy A, Filion M (2018) Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. *Environmental Microbiology* 20: 3905-3917.
- Cabrera HE, Aranda OS, Hernández CE, Nava DC, Mora AA, Vasquez LA (2019) First report of bacterial wilt caused by *Dickeya chrysanthemi* on agave-mezcal (*Agave cupreata*) in Mexico. *Plant Disease* 103: 1-3. DOI: 10.1094/PDIS-05-18-0877-PDN.
- Chávez-Parga MDC, Hernández EP, Hernández JCG (2016) Revisión del agave y el mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología* 18: 148-164.
- Chiniqy D, Barnes EM, Zhou J, Hartman K, Li X, Shefflin A, Pella A, Marsh E, Prenni J, Deutschbauer AM, Schachtman DP, Tringe SG (2021) Microbial community field surveys reveal abundant *Pseudomonas* population in sorghum rhizosphere composed of many closely related phylotypes. *Frontiers Microbiology* 12: 598180. DOI: 10.3389/fmicb.2021.598180.
- Coleman DD, Desgarenes D, Fonseca GC, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martínez PL, Tringe GS (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist* 209: 798-811.
- Cossus L, Roux-Dalvai F, Kelly I, Nguyen TTA, Antoun H, Droit A, Tweddell RJ (2021) Interactions with plant pathogens influence lipopeptides production and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strain PTB185. *Biological Control* 154: 104497. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104497.
- Czajkowski R, Perombelon MC, Van Veen JA, Van Der Wolf JM (2011) Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review *Plant pathology* 60: 999-1013.
- Desgarenes D, Garrido E, Torres GM, Peña CJ, Partida ML (2014) Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiology Ecology* 90: 844-857.
- Dimkić I, Janakiev T, Petrović M, Degrassi G, Fira D (2022) Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 117: 101754. DOI: 10.1016/j.pmpp.2021.101754.
- Dimopoulou A, Theologidis I, Benaki D, Koukounia M, Zervakou A, Tzima A, Diallinas G, Dimitris G, Skandalis N (2021) Direct antibiotic activity of Bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere* 6: e00376-21. DOI: 10.1128/mSphere.00376-21.
- El-Yazeid AA, Abou-Aly HA, Mady MA, Moussa SAM (2007) Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio phosphor) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 3: 274-286.
- Gerayeli N, Baghaee RS, Tarighi S (2018) Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Plant Pathology* 150: 1049-1063.

- Hoang VT, Stępniewski G, Czarnecka KH, Kasztelanica R, Long VC, Xuan KD, Buczyński R (2019) Optical properties of buffers and cell culture media for optofluidic and sensing applications. *Applied Sciences* 9: 1-11. DOI: 10.3390/app9061145.
- Huang XF, Chaparro JM, Reardon K, Zhang R, Shen Q, Vivanco JM (2014) Interacciones de la rizosfera: exudados de raíces, microbios y comunidades microbianas. *Botánica* 92: 267-275.
- Hu J, Zheng M, Dang S, Shi M, Zhang J, Li Y (2021) Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* LYZ69 against anthracnose of alfalfa (*Medicago sativa*). *Phytopathology* 111: 1338-1348.
- Idrissi NS, Ouarzane A, Elouazni L, Hymene A, Elantri S, Amine A (2021) Exploring rhizosphere and potato microbiome as potential antagonist to control blackleg and potato soft rot diseases in Morocco. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31: 41. DOI: 10.1186/s41938-021-00387-5.
- Jiménez HI, Virgen CG, Martínez VO, Vandemark G, Olalde PV (2004) Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 317-331.
- Joshi R, McSpadden Gardener BB (2006) Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 96: 145-154.
- Keswani C, Bisen K, Singh V, Sarma BK, Singh HB (2016) Formulation technology of biocontrol agents: Present status and future prospects. In: Arora N, Mehnaz S, Balestrini R (eds) *Bioformulations: for sustainable agriculture*. First edition. Springer, New Delhi. pp: 35-52.
- Kiesewalter HT, Lozano ACN, Wibowo M, Strube ML, Maróti G, Snyder D, Jørgensen ST, Larsen OT, Cooper SV, Weber T, Kovács TA (2021) Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi. *Msystems* 6: e00770-20. DOI: 10.1128/mSystems.00770-20.
- Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, Allende MR, Weller DM (2006) Enrichment and genotypic diversity of pHID-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture. *Microbiology Ecology* 55: 351-368.
- Larsen J, Jaramillo-López P, Nájera-Rincon M, González-Esquivel C (2015) Biotic interactions in the rhizosphere in relation to plant and soil nutrient dynamics. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15: 449-463.
- Lu Z, Guo W, Liu C (2018) Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 80: 427-433.
- Lugtemberg B, Kamilova F (2009) Plant growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review Microbiology*. 63: 541-556.
- Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, Van Veen JA, Tsai SM (2014) Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME journal* 8: 1577-1587.
- Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E (2011) Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *International Microbiology* 14: 213-223.
- Peng S, Zhou Q, Cai Z, Zhang Z (2009) Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of Hazardous Materials* 168: 1490-1496.
- Rivedal HM, Brazil JA, Frost KE (2021) Diversity and pathogenicity of *Pectobacterium* species responsible for causing soft rot and blackleg of potato in the Columbia basin. *American Journal of Potato Research* 98: 267-284.
- Salem EA, Abd El-Shafea YM (2018) Biological control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28(1): 1-5. DOI:/10.1186/s41938-018-0100-x.

- Shahid I, Han J, Hanoq S, Malik KA, Borchers CH Mehnaz S (2021) Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: 605195. DOI: 10.3389/fsufs.2021.605195.
- Sharma D, Gupta M, Gupta S (2016) Diversity of native rhizosphere pseudomonad of Jammu with potential for plant growth promoting activity. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry* 29: 62-67.
- Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56: 845-857.
- Torres I, Blancas J, León A, Casas A (2015) TEK, local perceptions of risk, and diversity of management practices of *Agave inaequidens* in Michoacán, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 11: 1. DOI: 10.1186/s13002-015-0043-1.
- Vega RKL, Uvalle BJX, Gómez LJF (2013) Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical Genetics* 51: 243-255.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology* 173: 697-703.
- Yang M, Thomashow LS, Weller DM (2021) Evaluation of the phytotoxicity of 2, 4-diacetylphloroglucinol and *Pseudomonas brassicacearum* Q8r1-96 on different wheat cultivars. *Phytopathology* DOI: 10.1094/PHTO-07-20-0315-R.
- Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton MJ, Lax S, Bokuñich AN, Mills AD, Martin G, Taghavi S, van der Leile D, Guilbert AJ (2015) The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* 6: e02527-14. DOI: 10.1128/mBio.02527-14.
- Zhang Q, Xing C, Kong X, Wang C, Chen X (2021) ChIP-seq Analysis of the global regulator Vfr reveals novel insights into the biocontrol agent *Pseudomonas protegens* FD6. *Frontiers in Microbiology* 12: 667637. Doi: 10.3389/fmicb.2021.66763712: 1156.
- Zhao P, Xue Y, Gao W, Li J, Zu X, Fu D, Bai X, Zuo Y, Hu Z, Zhang F (2018) Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides* 101: 10-16.
- Zhu YG, Lin X, Chu H (2022) Editorial: Rhizosphere microbiome special issue. *Plant Soil* 470: 1-3.