

Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO2 against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat

Mecanismos potenciales de biocontrol de *Bacillus* sp. TSO2 contra *Bipolaris sorokiniana*, mancha borrosa del trigo

Valeria Valenzuela-Ruiz, ¹Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur, 85000 Ciudad Obregón, Sonora, Mexico; Fannie I. Parra-Cota, Campo Experimental Norman E. Borlaug, INIFAP, Norman E. Borlaug km 12, C.P. 85000 Ciudad Obregón, Sonora, México; Gustavo Santoyo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México; ¹Sergio de los Santos-Villalobos*.

*Corresponding author: sergio.delossantos@itson.edu.mx

Received: January 19, 2022.

Accepted: April 07, 2022.

Valenzuela-Ruiz V, Parra-Cota FI, Santoyo G and de los Santos-Villalobos S. 2022. Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO2 against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 230-239.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2201-1>

Primera publicación DOI: 19 de Abril, 2022.

First DOI publication: April 19, 2022.

Abstract. *Bipolaris sorokiniana* is a pathogen of cereals such as wheat and barley, causing root rot, leaf blight, seedling blight, and spot blotch. This phytopathogen causes a considerable reduction in cereal yield of up to 85%. Thus, sustainable alternatives to the application of synthetic fungicides are determinants for the control of phytopathogens, such as the application of biological control agents. This study aims to identify the potential biocontrol mechanisms of the

Resumen. *Bipolaris sorokiniana* es un patógeno de cereales como el trigo y la cebada, que causa pudrición de la raíz, tizón de la hoja, tizón de la plántula y mancha borrosa. Este patógeno genera una reducción considerable en el rendimiento de cereales hasta en un 85%. Así, alternativas sostenibles a la aplicación de fungicidas sintéticos son determinantes para el control de fitopatógenos, como la aplicación de agentes de control biológico. El objetivo de este estudio es identificar los potenciales mecanismos de biocontrol de la cepa bacteriana TSO2, a través de la secuenciación, anotación y la minería de su genoma. El borrador del genoma de la cepa TSO2 se secuenció a través de la plataforma Illumina Miseq y presentó 4,242,212 pb, 43.9% de contenido de G+C, 300,069 pb N50, 5 L50, 47 contigs, 96 ARN y 4,432 secuencias de ADN codificantes (CDS, por sus siglas en inglés). Además, se detectó la presencia de 86 CDS de importancia agrícola involucrados en la virulencia, enfermedad, defensa, adquisición de hierro y metabolismo se-

bacterial strain TSO2 by sequencing, annotation, and mining its genome. The draft genome of strain TSO2 was sequenced through the Illumina Miseq platform and presented 4,242,212 bp, 43.9% G+C content, 300,069 bp N50, 5 L50, 47 contigs, 96 RNAs, and 4,432 predicted coding DNA sequences. Besides, the presence of 86 CDS of agricultural importance involved in virulence, disease, defense, iron acquisition, and secondary and phosphate metabolisms was detected. On the other hand, seven putative secondary metabolite gene clusters involved in biocontrol activity were identified in the genome of strain TSO2. *Bacillus* sp. TSO2 contains a great number of biosynthetic gene clusters which supports its biocontrol activity against phytopathogenic fungi. Thus, this strain needs to be further studied as a potential bioactive ingredient for the biopesticide formulation due to its high potential as a biological control agent.

Key words: Biological control agents, Genomics, antiSmash, biofungicide, sustainable agriculture.

Bipolaris sorokiniana is a pathogen of cereals, such as wheat (*Triticum turgidum*) and barley (*Hordeum vulgare*), causing root rot, leaf blight, seedling blight, and spot blotch. This disease affects seed germination and seedling emergence, generating a considerable reduction in yield of up to 85% (Mehta, 2014). Currently, disease management against *B. sorokiniana* is carried out through the foliar application of ergosterol biosynthesis disruptors from the triazole group, despite these being reported with harmful effects, such as soil contamination, inhibition of non-target organisms, and human cytotoxicity (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). In addition, this is strategy not only toxic to humans but also harmful to the environment and results in an imbalance within the

cundario y de fosfato. Por otro lado, se identificaron siete grupos de genes de metabolitos secundarios putativos en el genoma de la cepa TSO2. *Bacillus* sp. TSO2 contiene una gran cantidad de grupos de genes biosintéticos que favorece la actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos. Por lo tanto, esta cepa debe estudiarse más a fondo como un potencial ingrediente bioactivo para la formulación de bioplaguicidas, debido a su alto potencial como agente de control biológico.

Palabras clave. Agentes de control biológico, genómica, antiSmash, biofungicida, agricultura sostenible.

Bipolaris sorokiniana es un patógeno de cereales tales como el trigo (*Triticum turgidum*) y la cebada (*Hordeum vulgare*) y causante de pudrición de raíz, tizón foliar, tizón de la plántula y mancha borrosa. Esta enfermedad afecta la germinación de la semilla y la emergencia de la plántula, generando una reducción considerable en el rendimiento, de hasta 85% (Mehta, 2014). En la actualidad, el manejo de las enfermedades causadas por *B. sorokiniana* es llevado a cabo a través de la aplicación foliar de disruptores de la biosíntesis de ergosterol del grupo triazol, a pesar de reportes de efectos dañinos tales como la contaminación del suelo, la inhibición de organismos que no son objetivos y citotoxicidad humana (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019). Además, esta estrategia no es solo tóxica para humanos, sino también para el ambiente y resulta en un desbalance de la comunidad microbiana del suelo y un rápido aumento en la propagación de genes de resistencia (Ahmad *et al.*, 2018). Así, las alternativas sustentables a la aplicación de fungicidas sintéticos son decisivas para el control de fitopatógenos, tales como la aplicación de agentes de control biológicos.

soil microbial community and a rapid increase in the spread of resistance genes (Ahmad *et al.*, 2018). Thus, sustainable alternatives to the application of synthetic fungicides are determinants for the control of phytopathogens, such as the application of biological control agents.

Currently, the most studied, produced, and commercialized bacterial biological control agents are the *Bacillus* species, due to its high efficacy, safety, and ability to form spores, allowing it to prevail in most agroecosystems (Villareal-Delgado *et al.*, 2018; Córdova-Albores *et al.*, 2020). Thus, this study aims to identify the potential biocontrol mechanisms of the bacterial strain TSO2 by sequencing, annotation, and mining its genome to explore the use of this strain for biopesticides formulation.

In this way, strain TSO2 was isolated from the soil where durum wheat was planted commercially, in the Yaqui Valley, Mexico (27.3692°, 110.3886°), using a serial dilution method in Nutrient Agar (NA) culture medium at 28 °C for 2 days (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). After bacterial purification, this strain was cryopreserved, at -80 °C by using Nutrient Broth (NB) culture medium supplemented with 30% glycerol, in the Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2021). After purification, an agar plug of 0.5 cm diameter of *Bipolaris sorokiniana* TPQ3 mycelia was placed in the center of a Petri dish containing Potato Dextrose Agar (PDA), and strain TSO2 was inoculated at four equidistant points by triplicate around the phytopathogen and incubated for five days at 28 °C. Thus, strain TSO2 showed great biocontrol activity against *B. sorokiniana* TPQ3, inhibition zone of 8.0 ± 0.2 mm, through the production of extracellular diffusible compounds with strong antifungal activity, and cytotoxic activity (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019).

Hoy en día, los agentes de control biológicos más estudiados, producidos y comercializados son las especies de *Bacillus*, debido a su alta eficacia, seguridad y habilidad de formar esporas, lo cual le permite prevalecer en la mayoría de los agroecosistemas (Villareal-Delgado *et al.*, 2018; Córdova-Albores *et al.*, 2020). Así, el objetivo del presente estudio fue identificar los potenciales mecanismos de biocontrol de la cepa bacteriana TSO2 al secuenciar, anotar y minar su genoma para explorar el uso de esta cepa para la formulación de biopesticidas.

Así, se aisló la cepa TSO2 del suelo en el que se encontraba plantado trigo duro comercial en el Valle del Yaqui, México (27.3692°, 110.3886°), con un método de dilución serial en el medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) a 28 °C por 2 días (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2018). Después de la purificación bacteriana, la cepa fue criopreservada a -80 °C con Caldo Nutritivo (CN) como medio de cultivo suplementado con 30% de glicerol, en la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos (COLMENA) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2021). Después de la purificación, se colocó una pieza de agar de 0.5 cm de diámetro con micelio de *Bipolaris sorokiniana* TPQ3 en el centro de una caja de Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), y la cepa TSO2 se sembró en cuatro puntos equidistantes por triplicado alrededor del fitopatógeno y se incubó por cinco días a 28 °C. Así, la cepa TSO2 mostró una gran actividad de biocontrol contra *B. sorokiniana* TPQ3, una zona de inhibición de 8.0 ± 0.2 mm, a través de la producción de compuestos difusibles extracelulares con una fuerte actividad antifúngica, así como actividad citotóxica (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019).

Con base en estos hallazgos, la cepa TSO2 fue secuenciada para explorar más a fondo potenciales mecanismos de biocontrol. Se extrajo ADN genómico de alta calidad de un cultivo fresco de esta cepa sembrado en CN [24 h a 32 °C, usando

Based on these findings, strain TSO2 was sequenced to further explore potential biocontrol mechanisms. High-quality genomic DNA was extracted from a fresh culture of this strain grown in NB [24 h at 32 °C, using an orbital shaker at 121 rpm, obtaining 1×10^6 Colony Forming Units (CFU) mL^{-1}], and following the protocol described by Valenzuela-Aragon *et al.* (2018). Then, the bacterial DNA was sequenced by the Illumina MiSeq platform, obtaining a total of 3,584,209 total pair-end reads [2 x 300 base pairs (bp)]. The quality of the obtained reads was analyzed by FastQC version 0.11.5 (Andrews, 2010). Trimmomatic version 0.32 (Bolger *et al.*, 2014) was used to remove adapter sequences and low-quality bases, only 7.39% was dropped. Subsequently, *de novo* assembly was generated by SPAdes version 3.14.1 (Bankevich *et al.*, 2012), using the "--careful" parameter for error correction in reads. The assembled contigs were ordered by Mauve contig Mover version 2.4.0 (Darling *et al.*, 2004), using the reference genome of *Bacillus cabrialesii* TE3^T (Genebank accession number GCA_004124315.1) (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019), based on the highest similarity of the 16S rRNA gene, with 100% similarity and 100% completeness (Figure 1). In addition, plasmid detection was carried out by PlasmidFinder 2.0 (Carattoli *et al.*, 2014), where no plasmids were detected. Thus, the draft genome of strain TSO2 presented 4,242,212 bp; 43.9% G+C content; 300,069 bp N50; 5 L50; and 47 contigs (> 200bp).

The genome annotation of the studied strain was created through Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) server version 2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) (Overbeek *et al.*, 2013), by the default RASTtk pipeline (Figure 2). Thus, strain TSO2 showed a total of 96 RNAs and 4,432 predicted coding DNA sequences (CDS) distributed into 328 subsystems. The most abundant subsystem was

un agitador orbital a 121 rpm, con lo que se obtuvo 1×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (CFU, por sus siglas en inglés) mL^{-1}], y siguiendo el protocolo descrito por Valenzuela-Aragon *et al.* (2018). Luego, el ADN bacteriano fue secuenciado en la plataforma Illumina MiSeq, con lo que se obtuvo un total de 3,584,209 de lecturas pareadas [2 x 300 pares de bases (bp, por sus siglas en inglés)]. La calidad de las lecturas obtenidas fue analizada en FastQC versión 0.11.5 (Andrews, 2010). Se usó Trimmomatic versión 0.32 (Bolger *et al.*, 2014) para remover secuencias del adaptador y bases de baja calidad; solamente 7.39% de éstas no cumplieron los criterios de calidad. Después, se generó un ensamble *de novo* con SPAdes versión 3.14.1 (Bankevich *et al.*, 2012), usando el parámetro "--careful" para la corrección de errores en las lecturas. Los contigs ensamblados fueron ordenados con Mauve contig Mover, versión 2.4.0 (Darling *et al.*, 2004), utilizando el genoma de referencia de *Bacillus cabrialesii* TE3^T (número de acceso de Genebank GCA_004124315.1) (de los Santos Villalobos *et al.*, 2019), con base en la mayor similitud del gen 16S rRNA (100% de similitud y una completud de 100%) (Figura 1). Además, se llevó a cabo una detección de plásmidos con PlasmidFinder 2.0 (Carattoli *et al.*, 2014), los cuales no se detectaron. Así, el borrador del genoma de la cepa TSO2 presentó 4,242,212 bp; contenido de G+C de 43.9%; 300,069 bp N50; 5 L50 y 47 contings (> 200bp).

La anotación del genoma de la cepa estudiada se creó a través del servidor Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) versión 2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) (Overbeek *et al.*, 2013), usando RASTtk por defecto (Figura 2). Así, la cepa TSO2 presentó un total de 96 RNAs y 4,432 secuencias de ADN codificantes (CDS) predichos, distribuidos en 328 subsistemas. Los subsistemas más abundantes fueron los aminoácidos y derivados (307 CDS), seguidos de hidratos de carbono (252 CDS). Este

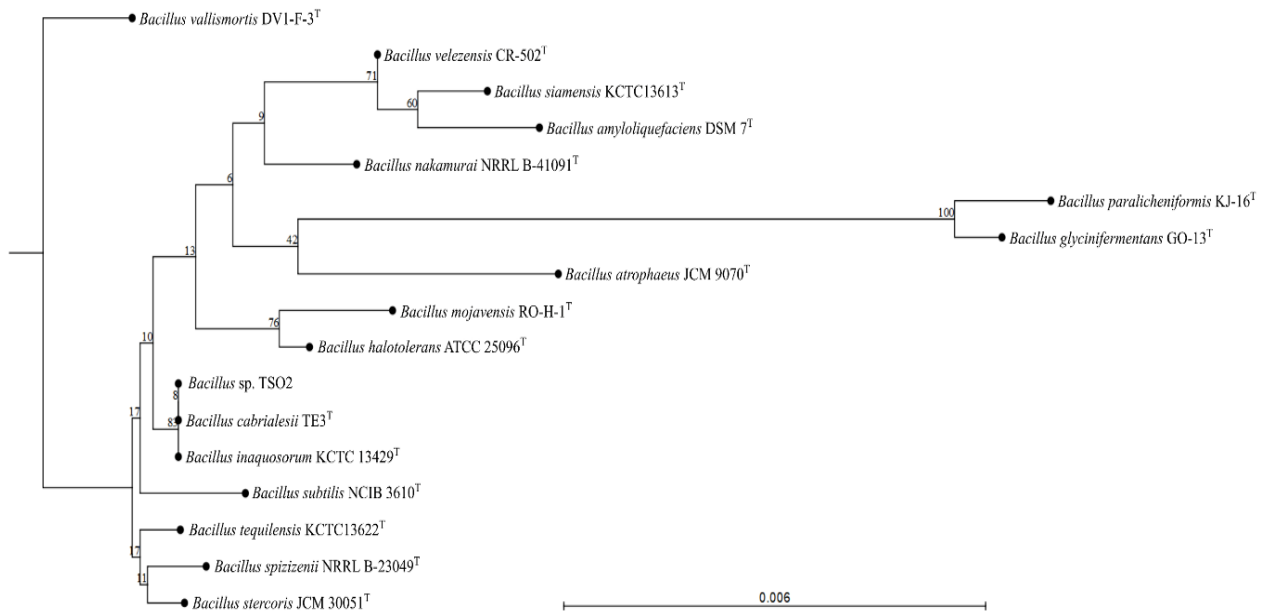


Figure 1. Phylogenetic Tree. Phylogenetic relation between strain TSO2 and closely related species: *Bacillus inaquosorum* KCTC 13429^T (AMXN01000021); *B. cabrialesii* TE3^T (MK462260); *B. spizizenii* NRRL B-23049^T (CP002905); *B. tequilensis* KCTC13622^T (AYTO0100004); *B. stercoris* JCM 30051^T (MN536904); *B. subtilis* NCIB 3610^T (ABQL01000001); *B. halotolerans* ATCC 25096^T (LPVF01000003); *B. mojavensis* RO-H-1^T (JH600280); *B. vallismortis* DV1-F-3^T (JH600273); *B. nakamurai* NRRL B-41091^T (JH600273); *B. velezensis* CR-502^T (AY603658); *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T (FN597644); *B. siamensis* KCTC13613^T (AJVF01000043); *B. atrophaeus* JCM 9070^T (AB021181); *B. glycinifermentans* GO-13^T (LECW01000063); *B. paralicheniformis* KJ-16^T (KY694465), constructed by CLC Sequence Viewer v8.0.0 (CLC bio A/S, Qiagen, Denmark) using the neighbor-joining algorithm (based on 1000 bootstrap replications). Scale bar (0.006) represents the number of nucleotide substitutions per site.

Figura 1. Árbol filogenético. Relación filogenética entre la cepa TSO2 y especies con una relación cercana: *Bacillus inaquosorum* KCTC 13429^T (AMXN01000021); *B. cabrialesii* TE3^T (MK462260); *B. spizizenii* NRRL B-23049^T (CP002905); *B. tequilensis* KCTC13622^T (AYTO0100004); *B. stercoris* JCM 30051^T (MN536904); *B. subtilis* NCIB 3610^T (ABQL01000001); *B. halotolerans* ATCC 25096^T (LPVF01000003); *B. mojavensis* RO-H-1^T (JH600280); *B. vallismortis* DV1-F-3^T (JH600273); *B. nakamurai* NRRL B-41091^T (JH600273); *B. velezensis* CR-502^T (AY603658); *B. amyloliquefaciens* DSM 7^T (FN597644); *B. siamensis* KCTC13613^T (AJVF01000043); *B. atrophaeus* JCM 9070^T (AB021181); *B. glycinifermentans* GO-13^T (LECW01000063); *B. paralicheniformis* KJ-16^T (KY694465), construido con CLC Sequence Viewer v8.0.0 (CLC bio A/S, Qiagen, Dinamarca) por medio del algoritmo de unión de vecinos (con base en 1000 replicaciones). La barra de escala (0.006) representa el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

amino acids and derivatives (307 CDS), followed by carbohydrates (252 CDS). This genome showed the presence of agricultural importance genes involved in i) virulence, disease, and defense (34 CDS), which include bacitracin stress response (7 CDS), resistance to antibiotics and toxic compounds (15 CDS), and invasion and intracellular resistance (12 CDS); and ii) iron acquisition and metabolism (30 CDS), including siderophores Bacillibactin (10 CDS) and Anthrachelin (5 CDS).

genoma demostró la presencia de genes de importancia agrícola involucrados en i) virulencia, enfermedad y defensa (34 CDS), que incluye la respuesta al estrés por bacitracina (7 CDS), resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos (15 CDS), así como a invasión y resistencia intracelular (12 CDS); y ii) adquisición y metabolización del hierro (30 CDS), incluyendo a los sideróforos Bacillibactina (10 CDS) y Antraquelina (5 CDS).

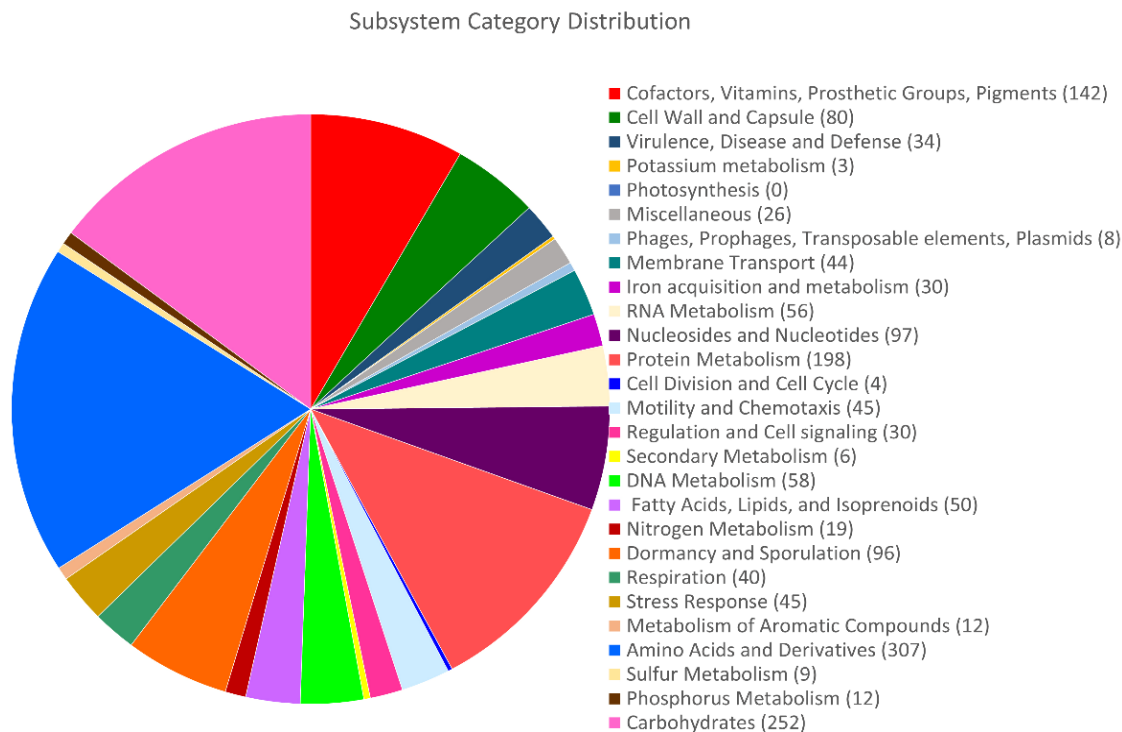


Figure 2. Coding sequences subsystem distribution from strain TSO2 generated through RASTtk pipeline. CDS: 4432, CDS in subsystems: 1204, and subsystems: 328.

Figura 2. Distribución de los subsistemas de secuencias de ADN codificantes de la cepa TSO2 generada a través deRASTtk. CDS: 4432, CDS en subsistemas: 1204, y subsistemas: 328.

Besides, the circular chromosome map was generated using the CGView Server (Grant and Stothard 2008) (Figure 3). In addition, using antiSMASH 5.2.0 under default parameters (Blin *et al.*, 2021), seven putative Biosynthetic Gene Clusters (BGC) were identified in the genome of strain TSO2 (Figure 3). For example i) Fengycin (100%), which is a lipopeptide with strong fungitoxic activity against filamentous fungi (Koumoutsis *et al.*, 2004); ii) Bacilysin (100%), a dipeptide with an impressively broad range of antagonistic activity against fungi and bacteria (Nannan *et al.*, 2021); iii) Subtilisin A (100%), a bacteriocin ribosomally produced with potent antimicrobial property (Ezrari *et al.*, 2021); iv) Bacillibactin (100%), an archetypal triscatetholate

Además, el mapa circular de cromosomas fue generado con el CGView Server (Grant y Stothard 2008) (Figura 3). Asimismo, con el uso de antiSMASH 5.2.0 bajo parámetros por defecto (Blin *et al.*, 2021), siete grupos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) putativos fueron identificados en el genoma de la cepa TSO2 (Figura 3). Por ejemplo i) la fengicina (100%), que es un lipopéptido con una fuerte actividad fungitóxica contra los hongos filamentosos (Koumoutsis *et al.*, 2004); ii) la bacilisina (100%), un dipéptido con un rango amplio de actividad antagonista contra hongos y bacterias (Nannan *et al.*, 2021); iii) la subtilosina A (100%), una bacteriocina producida de forma ribosomal con una potente propiedad antimicrobiana (Ezrari *et al.*, 2021); iv) la bacilibactina (100%), un

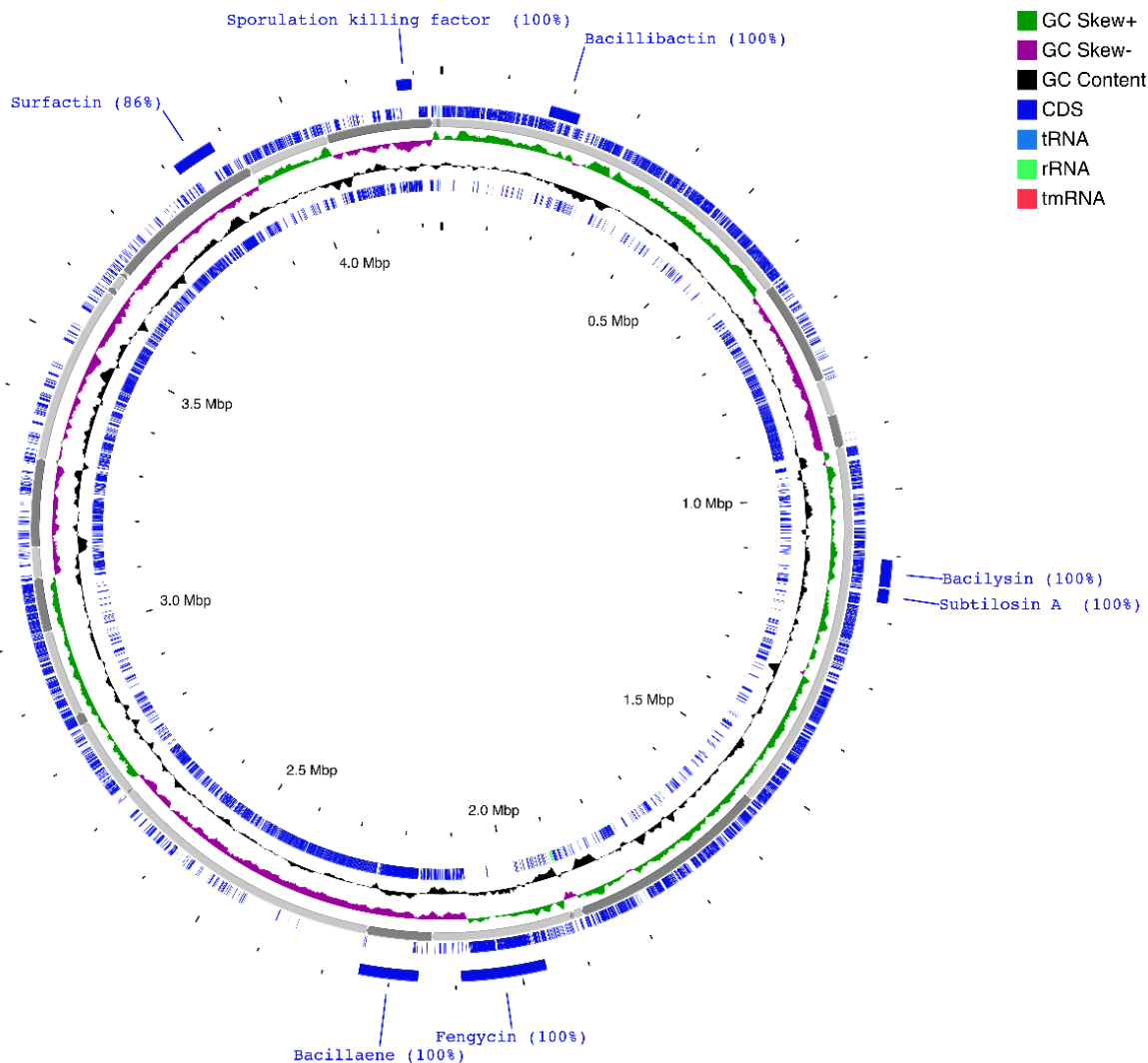


Figure 3. Circular Chromosome Map of *Bacillus* sp. strain TSO2, distribution of coding DNA sequences (CDS), tRNAs, rRNAs, and GC content skew (50% of the total base-pair window), as well as the Biosynthetic Gene Clusters (BGC) identified through antiSMASH.

Figura 3. Mapa circular del cromosoma de *Bacillus* sp. cepa TSO2, distribución de secuencias de ADN codificantes (CDS), tRNAs, rRNAs, y contenido de GC (50% de las pares de base), así como los grupos de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés) identificados a través de antiSMASH.

siderophore known for its highest affinity for iron (Fe^{3+}) of natural siderophores (Nithyapriya *et al.*, 2021); v) Bacillaene (100%), a polyketide which has an important biological role associated as antibiotic weapons for *Bacillus* to resist other environmental microbes (Li *et al.*, 2021); vi) Killing factor (100%), a peptide that induces the

sideróforo triscatetolato arquetípico conocido por su gran afinidad por el hierro (Fe^{3+}) de sideróforos naturales (Nithyapriya *et al.*, 2021); v) el bacilaeno (100%), un policétido que juega un papel biológico importante relacionado como arma antibiótica para que *Bacillus* pueda resistir otros microbios ambientales (Li *et al.*, 2021); vi) Killing factor (100%),

lysis of sibling no-sporulated and non-exogenous toxin resistant cells for nutrient resource, this providing the species a favorable trait in regards to sporulation, and hence competence in the niche (González-Pastor, 2010); and vii) Surfactin (86%), which is a powerful lipopeptide biosurfactant and a versatile bioactive molecule that has demonstrated antifungal, antiviral, antitumor, insecticide, antimycoplasma, and bioremediation agents in soil and water (Mulligan, 2005).

Bacillus sp. strain TSO2 contains a great number of Biosynthetic Gene Clusters (BGC) which support its biocontrol activity against phytopathogenic fungi. Thus, this strain needs to be further studied as a potential bioactive ingredient for the biopesticides formulation due to its high potential as a biological control agent by the secretion of antibiotics and antimicrobial peptides, and the production of siderophores.

Data availability. This draft genome sequence has been deposited in DDBJ/ENA/ GenBank under accession number JAHBMK000000000. The version described in this paper is the first version, JAHBMK000000000, under BioProject number PRJNA728132 and BioSample number SAMN19070894. Raw data is available under accession number SRR16775344.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge support by the CONACyT Project 257246 “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agrobiotecnológico”. We acknowledge funding from the Instituto Tecnológico de Sonora (PROFAPI_2022_0001) “Minería del genoma de *Bacillus* sp. TS02 para la identificación de genes asociados al control biológico de hongos fitopatógenos” Valeria Valenzuela Ruiz was supported by CONACYT fellowship 924892.

un péptido que induce la lisis de células hermanas no esporuladas y no exógenas resistentes a toxinas como fuente de nutrientes, con lo cual brinda a la especie con un rasgo favorable en cuanto a la esporulación, y por ello, a la competencia en el nicho (González-Pastor, 2010); y vii) la surfactina (86%), que es un poderoso biosurfactante y una molécula bioactiva versátil que ha demostrado ser un agente antifúngico, antiviral, antitumoral, insecticida, antimicoplasma y biorremediación en el suelo y en el agua (Mulligan, 2005).

Bacillus sp. cepa TSO2 contiene un gran número de grupos de genes biosintéticos (BGC) que apoyan su actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos. Así, esta cepa debe ser estudiada a mayor profundidad como un potencial ingrediente bioactivo para la formulación de biopesticidas, debido a su gran potencial como agente de control biológico por la secreción de antibióticos y de péptidos antimicrobiales, así como la producción de sideróforos.

Disponibilidad de datos. Este borrador de secuencia del genoma ha sido depositada en DDBJ/ENA/ GenBank bajo el número de acceso JAHBMK000000000. La versión descrita en el presente trabajo es la primera versión, JAHBMK000000000, bajo el número de BioProject PRJNA728132 y número de BioSample SAMN19070894. Datos sin procesar están disponibles bajo el número de acceso SRR16775344.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Proyecto 257246 del CONACyT “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agrobiotecnológico”, así como el apoyo por parte del Instituto Tecnológico de Sonora al proyecto PROFAPI_2022_0001

LITERATURE CITED

- Ahmad M, Pataczek L, Hilger TH, Zahir ZA, Hussain A, Rasche F, Schafleitner R and Solberg SØ. 2018. Perspectives of Microbial Inoculation for Sustainable Development and Environmental Management. *Frontiers in Microbiology* 9:2992. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02992>
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. (Consulted October 2021).
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SL, Pham s, Prjibelski AD, Pyshkin 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. *Journal Computational Biology* 19(5):455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Blin K, Shaw S, Kloosterman AM, Charlop-Powers Z, van Wezel GP, Medema MH and Weber T. 2021. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research* 49(w1): w39-w45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab335>
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Aarestrup FM and Hasman H. 2014. PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 58(7):3895–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Córdova-Albores LC, Zelaya-Molina LX, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruiz V, Cortés-Martínez NE, Parra-Cota FI, Burgos-Canul YY, Chávez-Díaz IF, Fajardo-Franco ML, de los Santos-Villalobos S. 2020. Omics Sciences Potential on Bioprospecting of Biological Control Microbial Agents: The Case of the Mexican Agro-Biotechnology. *Mexican Journal of Phytopathology* 39: 1–38. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2009-3>.
- Darling AC, Mau B, Blattner FR and Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* 14(7):1394-1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- de los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrea-Sepulveda A, Valenzuela-Aragon B y Estrada-Mora JC. 2018. Colmena: colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria nacional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9(1): 191-202. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- de los Santos-Villalobos S, Díaz-Rodríguez AM, Ávila-Mascareño MF, Martínez-Vidales AD, Parra-Cota FI. 2021. COLMENA: A Culture Collection of Native Microorganisms for Harnessing the Agro-Biotechnological Potential in Soils and Contributing to Food Security. *Diversity* 13: 1-13. <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- de los Santos-Villalobos S, Robles RI, Parra-Cota FI, Larsen J, Lozano P and Tiedje JM. 2019. *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) “Minería del genoma de *Bacillus* sp. TS02 para la identificación de genes asociados al control biológico de hongos fitopatógenos”. Valeria Valenzuela Ruiz recibió el apoyo del CONACYT mediante la beca de investigación 924892.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- in the Yaqui Valley, Mexico. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 69(12). <https://doi.org/10.1099/ijssem.0.003711>
- Ezrari S, Mhidra O, Radouane N, Tahiri A, Polizzi G, Lazraq A, Lahlali R. 2021. Potential Role of Rhizobacteria Isolated from Citrus Rhizosphere for Biological Control of Citrus Dry Root Rot. *Plants* 10 (872): 1-25. <https://doi.org/10.3390/plants10050872>
- González-Pastor J. 2010. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00253.x>
- Grant JR and Stothard P. 2008. The CGView server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res* 36:W181–W184. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn179>.
- Koumoutsis A, Chen X-H, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J and Borriss R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186: 1084–1096. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Li H, Han X, Dong Y, Xu S, Chen C, Feng Y, Cui Q and Li W. 2021. Bacillaenes: Decomposition Trigger Point and Biofilm Enhancement in *Bacillus*. *ACS Omega* 6: 1093–1098. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03389>
- Mehta YR. 2014. Foliar and stem diseases. 133–216p. *In: Mehta YR. (Ed.). Wheat diseases and their management.* Springer, Cham.
- Mulligan CN. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133: 183–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Nannan C, Vu HQ, Gillis A, Caulier S, N TTT and Mahillo J. 2021. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne pathogens. *Journal of Biotechnology* 327: 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.017>
- Nithyapriya S, Lalitha S, Sayyed RZ, Reddy MS, Dailin DJ, El Enshasy HA, Luh Suriani N and Herlambang S. 2021. Production, Purification, and Characterization of Bacillibactin Siderophore of *Bacillus subtilis* and Its Application for Improvement in Plant Growth and Oil Content in Sesame. *Sustainability* 13: 5394. <https://doi.org/10.3390/su13105394>

- Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T. *et al.*, 2013. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42: D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G, Arellano-Wattenbarger GL, de Los Santos-Villalobos S. 2018. Plant assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. *Plant Soil* 435:367-384.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos Villalobos S. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota FI, Castro-Longoria E, López-Cervantes J and de los Santos-Villalobos S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control* 132:135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>