




## Bacterias con actividad antifúngica asociadas a *Ocimum basilicum* L.

### *Ocimum basilicum* L. associated bacteria with antifungal activity

### *Ocimum basilicum* L. bacterias asociadas com atividade antifúngica

Pablo Misael Arce-Amezquita<sup>1</sup>, Mirella Romero-Bastidas<sup>2</sup> y  
Maurilia Rojas-Contreras<sup>3\*</sup>

Departamento Académico de Agronomía, Universidad Autónoma de Baja California Sur.  
Carretera al sur km 5.5, Col. El Mezquitito, 23080, La Paz, Baja California Sur, México.  
Correo electrónico: (PA) [parce@uabcs.mx](mailto:parce@uabcs.mx), , (MR) [miromero@uabcs.mx](mailto:miromero@uabcs.mx), , (MRC)  
[mrojas@uabcs.mx](mailto:mrojas@uabcs.mx), .

#### Resumen

La presencia de patógenos, como hongos, es una de las causas más importantes de pérdida de cultivos de albahaca en todo el mundo; sin embargo, muchos microorganismos tienen un papel crucial en el desarrollo de las plantas, incluida la protección contra los patógenos. En el presente estudio, se aislaron, cuantificaron y preservaron las bacterias predominantes asociadas a albahaca. La caracterización de las bacterias aisladas mostró 165 cepas Gram positivas, 152 con morfología bacilar y 13 con cocoide. Posteriormente, se realizaron ensayos de antagonismo *in vitro*, primero en contra *Aspergillus* spp. y posteriormente en contra de *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria*, spp. y *Aspergillus* spp. Finalmente, ensayos para evaluar el efecto de las bacterias aisladas sobre la germinación de semillas y las primeras etapas de desarrollo de albahaca fueron llevados cabo. Las plantas de albahaca muestreadas, producidas alrededor de La Paz, Baja California Sur, México, fueron colonizadas por bacterias antagonistas conocidas del género *Bacillus*. Las cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* fueron las que presentaron de forma predominante la actividad antifúngica. Además, las cepas ALMH42, ALMR73 y ALAH91 no mostraron ningún efecto deletéreo sobre el desarrollo de las plántulas de albahaca. La exploración del potencial biotecnológico de estas cepas aisladas de plantas sanas de albahaca es de gran interés para futuras aplicaciones en este y otros cultivos.

Recibido: 04-04-2021 • Aceptado: 08-06-2021.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: [mrojas@uabcs.mx](mailto:mrojas@uabcs.mx)

**Palabras clave:** *Bacillus* spp., albahaca, *Aspergillus* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp., bacteria antifúngica.

### Abstract

The presence of pathogens, like fungi, is one of the most important causes of basil crop loss around the world; however, many microorganisms have a crucial role on plant development including protection against pathogenic ones. In the present study, basil associated bacteria were isolated, quantified and preserved. Characterization of isolated bacteria showed 165 Gram positive strains, 152 with bacillary and 13 with coccoid morphology. Later, *in vitro* antagonism assays were performed, first against *Aspergillus* spp. and then against *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp. and *Aspergillus* spp. Finally, the effect of the isolated bacteria on basil seed germination and first stages of development were carried out. Sampled basil plants, produced around La Paz, Baja California Sur, Mexico, were colonized by known antagonistic bacteria of the *Bacillus* genus. *Bacillus amyloliquefaciens* strains were the prevailing species with antifungal activity. Moreover, strains ALMH42, ALMR73 and ALAH91 did not show any deleterious effect on basil seedling development. Biotechnological potential exploration of these isolated strains from healthy basil plants is of great interest for future applications on this and other crops.

**Keywords:** *Bacillus* spp., basil, *Aspergillus* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp., antifungal bacteria.

### Resumo

A presença de patógenos, como fungos, é uma das causas mais importantes de perda de lavouras de manjeriço em todo o mundo; entretanto, muitos microrganismos desempenham um papel crucial no desenvolvimento das plantas, incluindo proteção contra patógenos. No presente estudo, as bactérias associadas ao manjeriço predominantes foram isoladas, quantificadas e preservadas. A caracterização das bactérias isoladas mostrou 165 cepas Gram positivas, 152 com morfologia bacilar e 13 com cocóide. Posteriormente, foram realizados testes de antagonismo *in vitro*, primeiro contra *Aspergillus* spp. e mais tarde contra *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria*, spp. e *Aspergillus* spp. Por fim, foram realizados ensaios para avaliar o efeito das bactérias isoladas na germinação das sementes e nos estágios iniciais do desenvolvimento do manjeriço. As plantas de manjeriço amostradas, produzidas em torno de La Paz, Baja California Sur, México, foram colonizadas por bactérias antagonistas conhecidas do gênero *Bacillus*. As cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* foram aquelas que exibiram predominantemente atividade antifúngica. Além disso, as cepas ALMH42, ALMR73 e ALAH91 não apresentaram efeito deletério no desenvolvimento de mudas de manjeriço. A exploração do potencial biotecnológico dessas cepas isoladas de plantas saudáveis de manjeriço é de grande interesse para futuras aplicações nesta e em outras culturas.

**Palabras-chave:** *Bacillus* spp., Manjerição, *Aspergillus* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*, *Alternaria* spp., Bactéria antifúngica.

## Introducción

La sanidad y productividad de las plantas están relacionadas con su microbiota, dominada principalmente por bacterias y hongos (Purahong *et al.*, 2018). Las interacciones entre plantas y microorganismos han estado presentes durante mucho tiempo en la evolución, ya que los microorganismos han ayudado a las plantas a lidiar con la falta de nutrientes, condiciones estresantes y patógenos (Smith *et al.*, 2015). El estudio de las bacterias asociadas a las plantas, su potencial antagonista en el control de patógenos y su efecto como promotores del crecimiento comprende la acción de varios géneros y especies de bacterias que pueden aislarse de la superficie de los tejidos vegetales u obtenerse del interior de la planta (Daungfu *et al.*, 2019). En México y en muchas otras partes del mundo, la albahaca (*Ocimum basilicum* L., Fam. Lamiaceae) es una hierba aromática de importancia económica. En Baja California Sur, México, la producción de albahaca dulce fue de aproximadamente 1.685 toneladas al final del ciclo 2019 (SIAP 2019). La variedad Nuffar fue la principal albahaca dulce cultivada en el estado. Esta planta se utiliza en la industria alimentaria y en la medicina tradicional (Gilardi *et al.*, 2013). Las plantas de albahaca albergan una microbiota distintiva responsable del crecimiento, la calidad y la salud a través del metabolismo microbiano y las interacciones con el hospedador

## Introduction

Plant's health and productivity have been linked to their microbiota dominated mainly by bacteria and fungi (Purahong *et al.*, 2018). Interactions between plants and microorganism have been present for a long time in evolution, since microorganisms have helped plants to deal with lack of nutrients, stressful conditions, and pathogens (Smith *et al.*, 2015). The study of plant-associated bacteria, their antagonistic potential in control of pathogens and their effect as growth promoters comprise the action of several genera and species of bacteria that can be isolated from the surface of plant tissues or obtained from within the plant (Daungfu *et al.*, 2019). In Mexico, and many other parts of the world, basil (*Ocimum basilicum* L., Fam. Lamiaceae) is an economically important aromatic herb. In Baja California Sur, Mexico, production of sweet basil was approximately 1,685 tons at the end of 2019 cycle (SIAP 2019). Nuffar variety was the main sweet basil grown in the state. This plant is used in the food industry and in traditional medicine (Gilardi *et al.*, 2013). Basil plants shelter a distinctive microbiota responsible for growth, quality and health via microbial metabolism and host interactions (Adamović *et al.*, 2015). However, successive cultivation in the same soil for a long time is known to be associated with changes in physicochemical

(Adamović *et al.*, 2015). Sin embargo, se sabe que el cultivo sucesivo en el mismo suelo durante mucho tiempo está asociado con cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que a su vez, proporciona condiciones que causan enfermedades por patógenos, lo que lleva a pérdidas devastadoras de rendimiento. En este estudio, el objetivo fue aislar e identificar bacterias asociadas a plantas sanas de albahaca de cultivos alrededor de La Paz, Baja California Sur, México, con la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos patógenos sin afectar el desarrollo de las plántulas.

## Materiales y métodos

### Material vegetal y sitio experimental

Se tomaron muestras de plantas de albahaca de cultivos con condiciones agroecológicas similares dentro del área de La Paz, B.C.S. México. Se seleccionaron aleatoriamente por cultivo tres plantas adultas de albahaca, listas para la cosecha, aparentemente sanas, con partes aéreas intactas (hojas normales sin manchas ni alteraciones de color), tallos sin deformaciones, separadas al menos 50 metros entre sí. Las ubicaciones de los cultivos fueron: Pescadero (Pradera Escolar 23° 21' 56"N, 110° 10' 27"O) y Las Maravillas (23° 21' 43"N, 110° 11' 18"O), Todos Santos (Sueño Tropical 23° 31' 29"N, 110° 17' 15"O) y Los Planes (Cesar Cárdenas, 23° 57' 11"N, 109° 55' 50"O). La raíz, el tallo y las hojas de cada planta se separaron y se colocaron

properties of the ground, which in turn, provides conditions that cause diseases by pathogens, leading to devastating yield losses. In this study, the objective was to isolate and identify bacteria associated to healthy basil plants from crops around La Paz, Baja California Sur, Mexico, with the ability to inhibit pathogenic fungi development without affecting seedling development.

## Material and methods

### Plant material and experimental site

Samples of basil plants were taken from crops with similar agroecological conditions within the area of La Paz, B.C.S. México. Three adult basil plants, ready for harvest, apparently healthy, with intact aerial parts (normal leaves without spots or color alterations), stems without deformations, separated at least 50 meters one from each other, were randomly selected per crop. The crop locations were: Pescadero (Pradera Escolar 23° 21' 56"N, 110° 10' 27"W) and Las Maravillas (23° 21' 43"N, 110° 11' 18"W), Todos Santos (Sueño Tropical 23° 31' 29"N, 110° 17' 15"W) and Los Planes (Cesar Cárdenas, 23° 57' 11"N, 109° 55' 50"W). Root, stem and leaves of each plant were separated and placed in sterile plastic bags. Later, the samples were transported to the Laboratory where the microbiological analysis was carried out.

### Isolation of bacteria

To isolate predominant bacteria, two culture media were used. Standard

en bolsas de plástico estériles. Posteriormente, las muestras fueron transportadas al Laboratorio donde se realizó el análisis microbiológico.

### Aislamiento de bacterias

Para aislar las bacterias predominantes, se utilizaron dos medios de cultivo. Se utilizó agar para métodos estándar o agar de recuento en placa (SMA, DIFCO) para aislar las bacterias y se utilizó agar de Man Rogosa y Sharp (MRS, DIFCO) para aislar las bacterias del ácido láctico. Brevemente, se colocaron 10 g de raíz, tallo u hojas en 90 ml de solución salina tampón fosfato (PBS) (NaCl 145 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,87 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  6,95 mM, pH 7,2) y se trituraron con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel) hasta obtener una suspensión. Se prepararon diluciones en serie y luego se extendieron 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución en placas de Petri duplicadas que contenían: SMA y MRS, las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h. Las bacterias de colonias predominantes y morfológicamente diferentes se cruzaron y purificaron en placas que contenían el mismo medio que la placa en la que crecieron primero. Las bacterias se caracterizaron mediante tinción de Gram y morfología celular bajo un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse E-600), luego se inocularon en caldo de soya tréptico (TSB, DIFCO), se incubaron durante la noche a la temperatura anterior y se conservaron con glicerol al 50 % a -80 °C. (Goldman y Green 2009). Las bacterias aisladas se etiquetaron de la siguiente manera: las dos primeras letras corresponden a la planta

methods agar or plate count agar (SMA, DIFCO) was used to isolate bacteria and de Man Rogosa and Sharp agar (MRS, DIFCO) was used to isolate lactic acid bacteria. Briefly, 10 g of root, stem or leaves were placed into 90 mL of phosphate buffer saline (PBS) (145 mM NaCl, 2.87 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 6.95 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.2) and triturated with a tissue homogenizer (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel) until a suspension was obtained. Serial dilutions were prepared and then 100  $\mu\text{L}$  of each dilution was spread on duplicated Petri dishes containing: SMA and MRS, the plates were incubated at 35 °C for 24 h. Bacteria from predominant and morphologically different colonies were cross streaked and purified onto plates containing the same media as the plate they grew first. Bacteria were characterized by Gram staining and cell morphology under a phase contrast microscope (Nikon Eclipse E-600), then inoculated in Tryptic Soy Broth (TSB, DIFCO) and incubated overnight at the above temperature and preserved with 50 % glycerol at -80 °C (Goldman and Green 2009). The isolated bacteria were labeled as follows: first two letters correspond to the investigated plant, in this case AL for basil; third letter corresponds to culture media they were isolated from, A for standard methods agar and M for de Man Rogosa and Sharpe medium. Fourth letter corresponds to the part of the plant sampled: R for root, T for stem and H for leaves. First number corresponds to the sampling area: 1-3 corresponds to Pescadero, 4-6 corresponds to Los Planes and 7-9

investigada, en este caso AL para albahaca; La tercera letra corresponde al medio de cultivo del que se aislaron, A para los métodos estándar de agar y M para el medio de Man Rogosa y Sharpe. La cuarta letra corresponde a la parte de la planta muestreada: R para raíz, T para tallo y H para hojas. El primer número corresponde al área de muestreo: 1-3 corresponde a Pescadero, 4-6 corresponde a Los Planes y 7-9 corresponde a Todos Santos. Finalmente, el último número corresponde a la colonia aislada.

### **Hongos modelo utilizados en ensayo antagonista**

Los hongos utilizados en este estudio fueron *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. y *Hendersonula* spp. actualmente identificado como *Neoscytalidium dimidiatum*. *Aspergillus* spp. proviene de un cultivo monospórico aislado de suelo y caracterizado por su morfología colonial (macroscópica) y celular (microscópica) según claves taxonómicas generales en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de esta Universidad. Este hongo se utilizó en esta investigación como modelo para realizar el primer cribado de bacterias con capacidad antagonista. *Alternaria* spp. y *N. dimidiatum* también provienen de un cultivo monospórico y fueron previamente aislados de *Ocimum basilicum* L. y *Ficus benjamina* respectivamente (Hernández-Montiel *et al.*, 2018). Estos hongos se utilizaron como modelo para importantes patógenos vegetales en esta región.

### **Ensayo antifúngico cualitativo**

La actividad antifúngica se detectó mediante una metodología

corresponde to Todos Santos. Finally, the last number corresponds to the isolated colony.

### **Model Fungi used in antagonistic assay**

The fungi used in this study were *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. and *Hendersonula* spp. currently identified as *Neoscytalidium dimidiatum*. *Aspergillus* spp. comes from a monosporic culture isolated from soil and characterized by its colonial (macroscopic) and cellular (microscopic) morphology according to general taxonomic keys in the Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos at this University. This fungus was used in this research as a model to carry out the first screening of bacteria with antagonistic capacity. *Alternaria* spp. and *N. dimidiatum* also come from a monosporic culture and were previously isolated from *Ocimum basilicum* L. and *Ficus benjamina* respectively (Hernández-Montiel *et al.*, 2018). These fungi were used as a model for important plant pathogens in this region.

### **Qualitative antifungal assay**

The antifungal activity was detected using a methodology developed by our research group. The confrontation assays against *Aspergillus* spp. were carried out in a method previously described (Joo *et al.*, 2015), modified with dual culture plates containing a mixture of TSA and PDA at 1:1 ratio. The isolated and purified bacteria were inoculated at 1 % in TSB and incubated overnight at 30 °C, then 10 µL drop of the suspension was placed on each Petri dish at 15 mm away from the edge.



desarrollada por nuestro grupo de investigación. Los ensayos de confrontación contra *Aspergillus* spp. se llevaron a cabo mediante un método previamente descrito (Joo *et al.*, 2015), modificado con placas de cultivo dual conteniendo una mezcla de TSA y PDA en proporción 1: 1. Las bacterias aisladas y purificadas se inocularon al 1 % en TSB y se incubaron durante la noche a 30 °C, luego se colocaron gotas de 10 µL de la suspensión en cada placa de Petri a 15 mm del borde. Las placas se incubaron durante 24 ha 30 °C. Posteriormente, se impregnó un disco de papel de filtro de 4 mm de diámetro, humedecido con PBS, con esporas de *Aspergillus* spp. colonia cultivada durante 72 h a 30 °C en medio PDA, y luego colocada a 15 mm de la colonia de bacterias. Los cultivos duales, realizados por duplicado, se incubaron durante 72 h a 30 °C y luego se observaron las zonas de inhibición. Se utilizó como control positivo una placa de Petri inoculada únicamente con el disco que contenía el hongo.

### Ensayo antimicótico confirmatorio

El crecimiento de las bacterias que mostraron claramente una zona de inhibición de *Aspergillus* spp. se probó contra *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y *Alternaria* spp. utilizando la metodología desarrollada por nuestro grupo de investigación. Las cepas bacterianas reactivadas en TSB se inocularon al 1 % en tubos con el mismo medio y se incubaron durante 24 ha 30 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 3.500 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los sedimentos en el mismo volumen

The dishes were incubated for 24 h at 30 °C. Subsequently, a 4 mm diameter filter paper disk, moistened with PBS was impregnated with spores of an *Aspergillus* spp. colony grown for 72 h at 30 °C in PDA medium, and then placed 15 mm away from the bacteria colony. The dual cultures, performed in duplicate, were incubated for 72 h at 30 °C and then inhibition zones were observed. A Petri dish inoculated only with the disc containing the fungus was used as positive control.

### Confirmatory antifungal assay

The growth of bacteria that clearly showed an inhibition zone of *Aspergillus* spp. were tested against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp. using methodology developed by our research group. Bacterial strains reactivated in TSB were inoculated at 1 % in tubes with the same medium and incubated for 24 h at 30 °C. Subsequently, they were centrifuged at 3,500 rpm, the supernatant was decanted, and the pellets were resuspended in the same volume of PBS. Parallely, the fungi were cultivated in PDA for 72 h, its spores were collected, and its concentration was adjusted to 10<sup>6</sup> spores mL<sup>-1</sup> by direct count, under the microscope using a Neubauer plate. Then, 0.1 mL of the suspensions were spread onto TSA-PDA 1:1 Petri dishes. Later three 10 µL drops of each bacterial suspension were evenly distributed on the plate previously spread with a fungus. The plates were then incubated at 30 °C for 72 h. After the incubation time, the zone of inhibition was measured in millimeters. Two replicates were made

de PBS. Paralelamente, los hongos se cultivaron en PDA durante 72 h, se recolectaron sus esporas y se ajustó su concentración a 106 esporas mL<sup>-1</sup> por conteo directo, bajo el microscopio utilizando una placa Neubauer. Luego, se esparcieron 0,1 ml de las suspensiones sobre placas Petri TSA-PDA 1:1. Posteriormente se distribuyeron uniformemente tres gotas de 10 µL de cada suspensión bacteriana sobre la placa previamente esparcida con un hongo. A continuación, las placas se incubaron a 30 °C durante 72 h. Después del tiempo de incubación, se midió la zona de inhibición en milímetros. Se realizaron dos réplicas por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. Se midieron las zonas de inhibición y se seleccionaron bacterias con grandes zonas de inhibición (más de 10 mm) para la identificación molecular.

### Identificación molecular

Las bacterias se identificaron mediante secuenciación del gen 16S rDNA. El ADN total se extrajo siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation). La PCR se llevó a cabo utilizando cebadores universales pA (directo): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y pH (inverso): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' siguiendo el método de Broda *et al.* (1999). Los amplicones se purificaron y luego se secuenciaron. Los datos obtenidos se procesaron mediante búsquedas BLAST en el NCBI y se cargaron en la base de datos de GenBank.

per treatment and the experiment was repeated twice. Inhibition zones were measured and bacteria with large inhibition zones (more than 10 mm) were selected for molecular identification.

### Molecular identification

Bacteria were identified by 16S rDNA gene sequencing. Total DNA was extracted following manufacturers recommendation (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation). PCR was carried out using universal primers pA (forward): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and pH (reverse): 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' following Broda *et al.* (1999) method. The amplicons were purified and then sequenced. The obtained data was processed using BLAST searches in the NCBI and uploaded to GenBank database.

### Germination test

Microtubes were filled with one hundred twenty basil seeds. The seeds were disinfected with a 4.25 % aqueous sodium hypochlorite solution for 2 minutes, rinsed with sterile distilled water three times. Then seeds were inoculated with the suspension of bacteria that presented antifungal activity against *Aspergillus* spp. containing 10<sup>6</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> and let stand for two minutes. The supernatant was decanted, and the seeds were set in a completely random design which consisted of four replicates of 30 seeds per treatment and controls. The seeds were placed in Petri dishes with a filter paper covering the bottom of the plate. Water was added to moisten the seeds and then let stand for 5 days in



### Prueba de germinación

Los microtubos se llenaron con ciento veinte semillas de albahaca. Las semillas se desinfectaron con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 4,25 % durante 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Luego se inocularon semillas con la suspensión de bacterias que presentaban actividad antifúngica contra *Aspergillus* spp. que contiene 106 CFU.mL<sup>-1</sup> y se dejó reposar durante dos minutos. Se decantó el sobrenadante y las semillas se distribuyeron en un diseño completamente aleatorio que consistió en cuatro repeticiones de 30 semillas por tratamiento y controles. Las semillas se colocaron en placas de Petri con un papel de filtro que cubría el fondo de la placa. Se añadió agua para humedecer las semillas y luego se dejó reposar durante 5 días en la oscuridad en una cámara de germinación a 25 °C. La rotura de la testa se consideró como indicación de germinación. Las plántulas de cinco días se separaron mediante hipocótilo y radícula, la longitud de todas las plántulas se midió con el software RootNav (Pound *et al.*, 2013), luego se secaron y pesaron para obtener biomasa seca. La significancia de los resultados obtenidos se analizó mediante análisis de varianza univariante (ANOVA), se utilizó como factor fijo la inoculación de semillas con diferentes bacterias. La diferencia entre las medias se determinó mediante la prueba de Tukey de rango múltiple HSD en  $p = 0,05$ . Los valores medios se consideraron significativamente diferentes cuando  $p \leq 0,05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SAS (Statistical Analysis System (SAS), SAS University Edition).

the dark in a germination chamber at 25 °C. Testa rupture was considered as indication of germination. Five days old seedlings were separated out by hypocotyl and radicle, length of all seedlings was measured by the software RootNav (Pound *et al.*, 2013), then dried and weighted to obtain dry biomass. The significance of the obtained results was analyzed by one-way univariate analysis of variance (ANOVA), seed inoculation with different bacteria was used as a fixed factor. The difference between the means was determined by Tukey's test HSD multiple range test at  $p = 0.05$ . Mean values were considered significantly different when  $p \leq 0.05$ . Statistical analysis was carried out using SAS software (Statistical Analysis System (SAS) software, SAS University Edition).

### Results and discussion

The microbiological status of healthy basil plants should be determined by the growing conditions, the environment of the region, the method of cultivation and the associated beneficial microbiota at any stage of their production process. In this study a total of 165 isolates were obtained from the predominant microbiota of different parts of the sampled apparently healthy basil plants from different sites. Ninety-four isolates were from SMA and 71 from MRS media used in the microbiological analysis, all of them were Gram positive, 152 with bacillary and 13 with coccoid morphology.

## Resultados y discusión

El estado microbiológico de las plantas de albahaca sanas debe estar determinado por las condiciones de crecimiento, el medio ambiente de la región, el método de cultivo y la microbiota beneficiosa asociada en cualquier etapa de su proceso de producción. En este estudio se obtuvo un total de 165 aislamientos de la microbiota predominante de diferentes partes de las plantas de albahaca aparentemente sanas muestreadas en diferentes sitios. Noventa y cuatro aislamientos fueron de SMA y 71 de medios MRS utilizados en el análisis microbiológico, todos fueron grampositivos, 152 con morfología bacilar y 13 con morfología cocoide. Entre las bacterias colonizadoras de plantas más comunes se encuentran las del género *Bacillus* (Moffat, 2001). Se sabe que la resistencia sistémica inducida es desencadenada por miembros beneficiosos del microbioma de la raíz en una amplia gama de plantas hospedantes, lo que las hace resistentes contra diversas amenazas patógenas. Esta mejora sistémica también se ha descrito para muchas bacterias promotoras del crecimiento de plantas del género *Bacillus* (Pieterse *et al.*, 2014). Es bien sabido que las bacterias del género *Bacillus* tienen la capacidad de producir una serie de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana (Raaijmakers, 2010).

El ensayo de confrontación cualitativa de 165 aislamientos contra *Aspergillus* spp. resultó en 15 cepas de bacilos que inhibieron el crecimiento del hongo en diferentes grados (figura 1). Se aislaron cepas antagonistas de la

Among the most common plant colonizing bacteria, we can find those of the *Bacillus* genus (Moffat, 2001). It is known that induced systemic resistance is triggered by beneficial members of the root microbiome in a wide range of plant hosts making them resistant against various pathogenic threats. This systemic enhancement has also been described for many plant growth-promoting bacteria of the *Bacillus* genus (Pieterse *et al.*, 2014). It is well known that bacteria of the *Bacillus* genus have the capability of producing a series of bioactive compounds with antimicrobial activity (Raaijmakers, 2010).

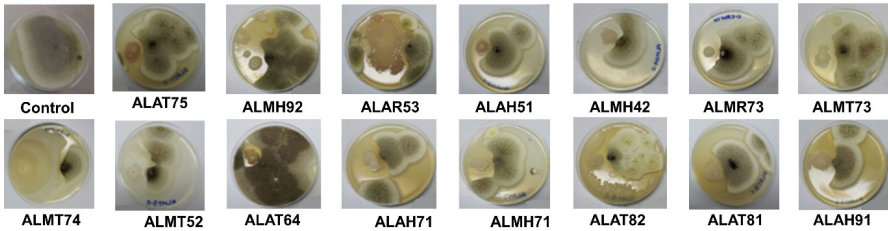
The qualitative confrontation assay of the 165 isolates against *Aspergillus* spp. resulted in 15 bacilli strains that inhibited the growth of the fungus at different degrees (figure 1). Antagonistic strains were isolated from aerial part of plants collected in the towns of Los Planes and Todos Santos. It is known that conditions on the plant leaves and stem (aerial part) are harsh for bacteria resulting in local microsites at which conditions are favorable for growth and/or survival (Jacobs *et al.*, 2005).

The confirmative confrontation assay against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp., performed with the fifteen bacterial strains that showed antagonistic activity, confirmed the growth inhibition of fungi by some of them. Bacterial strains presented non regular inhibition zones on fungi growth; therefore, length and width measurements of the inhibition area were documented (table 1). This

parte aérea de plantas recolectadas en las localidades de Los Planes y Todos Santos. Se sabe que las condiciones en las hojas y el tallo de la planta (parte aérea) son adversas para las bacterias, lo que da como resultado micrositios locales en los que las condiciones son favorables para el crecimiento y/o la supervivencia (Jacobs *et al.*, 2005).

behavior was observed because some bacteria are highly mobile.

Results of the molecular identification of bacteria with confirmed antifungal activity, showed that all of them belong to the *Bacillus* genus according to BLAST similarity analysis (table 2). *Bacillus* isolates like *B. subtilis*, *B. methylotrophicus*



**Figura 1. Ensayo cualitativo de bacterias aisladas con actividad antagonista frente a *Aspergillus* spp. en placas de Petri TSA-PDA 50/50 después de una incubación de 72 h a 30 °C.**

**Figure 1. Qualitative test of isolated bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus* spp. on TSA-PDA 50/50 Petri dishes after incubation for 72 h at 30 °C.**

El ensayo de confrontación confirmativa contra *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y *Alternaria* spp., realizado con las quince cepas bacterianas que mostraron actividad antagonista, confirmó la inhibición del crecimiento de hongos por algunas de ellas. Las cepas bacterianas presentaron zonas de inhibición no regulares sobre el crecimiento de hongos; por lo tanto, se documentaron las medidas de largo y ancho del área de inhibición (cuadro 1). Este comportamiento se observó porque algunas bacterias son muy móviles.

and *B. amyloliquefaciens* have been shown to have antagonistic activity against common plant pathogenic fungi. These bacteria species have been considered efficient colonizers that are widely spread due to their capacity to form spores, to grow in a wide range of temperatures and to produce antibiotic compounds that inhibit phytopathogens growth, besides being plant growth promoters (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

In this investigation eight strains with antifungal activity against *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and/or *Alternaria* spp., found in the samples obtained from basil plants,

**Cuadro 1. *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y *Alternaria* spp. zonas de inhibición del crecimiento generadas por cepas bacterianas con actividad antifúngica confirmada.**

**Table 1. *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* and *Alternaria* spp. growth inhibition zones generated by bacterial strains with confirmed antifungal activity.**

Strain ID	<i>Aspergillus</i> spp.		<i>N. dimidiatum</i>		<i>Alternaria</i> spp.	
	Length inhibition zone (mm)	Width inhibition zone (mm)	Length inhibition zone (mm)	Width inhibition zone (mm)	Length inhibition zone (mm)	Width inhibition zone (mm)
ALMH42	< 10	< 10	28	28	< 10	< 10
ALMR73	< 10	< 10	< 10	< 10	31	25
ALMT73	23	18	30	31	28	26
ALAH71	< 10	< 10	< 10	< 10	30	31
ALAT82	< 10	< 10	< 10	< 10	30	26
ALAT81	< 10	< 10	30	26	28	24
ALAH91	< 10	< 10	30	30	< 10	< 10
ALAT75	< 10	< 10	23	27	< 10	< 10

Los resultados de la identificación molecular de bacterias con actividad antifúngica confirmada, mostraron que todas ellas pertenecen al género *Bacillus* según el análisis de similitud BLAST (cuadro 2). Se ha demostrado que aislados de *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* tienen actividad antagonista contra hongos patógenos de plantas comunes. Estas especies de bacterias han sido consideradas colonizadoras eficientes y ampliamente diseminadas debido a su capacidad para formar esporas, crecer en un amplio rango de temperaturas y producir compuestos antibióticos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, además de ser promotores del crecimiento vegetal (Rios-Velasco *et al.*, 2016).

were identified and six of them belong to *B. amyloliquefaciens*. This is a microorganism that grows mainly in the rhizosphere, it begins to grow close to the formation point of lateral roots and it spreads on the root surface (Lugtenberg and Kamilova, 2005). Nowadays, it has been demonstrated that inoculation of crops with *B. amyloliquefaciens* strains could increase production under stressful conditions like nutrient limitations or high salinity levels (Kim *et al.*, 2017). It also has been observed that it could help to control other pathogens either by competing for nutrients or by producing antibiotics and lytic enzymes; particularly, the molecular basis of its plant growth-promoting activity is mainly based on the production of secondary

**Cuadro 2. Identificación molecular de bacterias aisladas de plantas de albahaca aparentemente sanas que presentaron actividad antifúngica.**

**Table 2. Molecular identification of isolated bacteria from apparently healthy plants of basil which present antifungal activity.**

Isolated strain	Molecular identification	Place of origin	Part of the plant	Access # GenBank
ALMH42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Cesar Cárdenas, Los Planes	Leaves	MT940837
ALMR73	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Root	MT940838
ALMT73	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940839
ALAH71	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Leaves	MT940840
ALAT82	<i>Bacillus velezensis</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940841
ALAT81	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940848
ALAH91	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Leaves	MT940842
ALAT75	<i>Bacillus subtilis</i>	Sueño Tropical, Todos Santos	Stem	MT940843

En esta investigación se identificaron ocho cepas con actividad antifúngica contra *Aspergillus* spp., *N. dimidiatum* y/o *Alternaria* spp., encontradas en las muestras obtenidas de plantas de albahaca, y seis de ellas pertenecen a *B. amyloliquefaciens*. Este es un microorganismo que crece principalmente en la rizosfera, comienza a crecer cerca del punto de formación de las raíces laterales y se disemina sobre la superficie de la raíz (Lugtenberg y Kamilova, 2005). En la actualidad, se ha demostrado que la

metabolites suppressing competitive microbial pathogens occurring in the plant rhizosphere, secretion of the plant growth hormone auxin and the synthesis of volatiles stimulating plant growth and induced systemic resistance (Chen *et al.*, 2009). In addition, some *B. amyloliquefaciens* strains could decrease the incidence of nematodes in some cultivars (Liu *et al.*, 2013). Other species found with antagonistic activity against fungi were *B. velezensis* and *B. subtilis*, members of the *Bacillus* genus as well and

inoculación de cultivos con cepas de *B. amyloliquefaciens* podría aumentar la producción en condiciones estresantes como limitaciones de nutrientes o altos niveles de salinidad (Kim *et al.*, 2017). También se ha observado que podría ayudar a controlar otros patógenos, ya sea compitiendo por los nutrientes o produciendo antibióticos y enzimas líticas; particularmente, la base molecular de su actividad promotora del crecimiento vegetal se basa principalmente en la producción de metabolitos secundarios que suprimen los patógenos microbianos competitivos que se encuentran en la rizosfera de las plantas, la secreción de la hormona del crecimiento vegetal auxina y la síntesis de volátiles que estimulan el crecimiento de las plantas y la resistencia sistémica inducida (Chen *et al.*, 2009). Además, algunas cepas de *B. amyloliquefaciens* podrían disminuir la incidencia de nematodos en algunos cultivares (Liu *et al.*, 2013). Otras especies encontradas con actividad antagonista contra los hongos fueron *B. velezensis* y *B. subtilis*, miembros del género *Bacillus* también y estrechamente relacionados con *B. amyloliquefaciens* (Rabbee *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que la colonización microbiana tiene un impacto importante en la calidad de la albahaca dulce, especialmente en la acumulación de importantes metabolitos secundarios como el aceite esencial (Banchio *et al.*, 2009). Esta capacidad excepcional es de gran importancia cuando interesa la producción de productos de alta calidad.

closely related to *B. amyloliquefaciens* (Rabbee *et al.*, 2019). Also, it has been shown that microbial colonization has an important impact on sweet basil quality, especially on accumulation of important secondary metabolites like essential oil (Banchio *et al.*, 2009). This outstanding ability is of great importance when production of high-quality products is of interest.

Strains with observed antagonistic effect against *Aspergillus* spp. were used in a germination experiment to determine the effect of the bacteria on total germination, length, and biomass production of basil seedlings. The total seed germination reached between 80 and 90 %. Figure 2 shows that all tested bacteria had no significant difference on total germination of basil seeds as compared to the control. Other reports regarding *Capsicum annuum* seed treatment with *B. amyloliquefaciens* resulted in maximum enhancement of seed germination (84.75 %), seedling vigor (1,423.8) along with an increase in vegetative growth parameters (Gowtham *et al.*, 2018). Recently, a culture-independent next-generation sequencing-based approach was applied to investigate the beneficial impact of *B. amyloliquefaciens* L-S60 on the composition and dynamics of rhizosphere microbiota, and growth conditions of cucumbers during plug seedling. Application of L-S60 significantly altered the structure of the bacterial community associated with the cucumber seedling. Presence of beneficial rhizosphere species such as *Bacillus*, *Rhodanobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Nonomuraea*, and *Agrobacterium* was



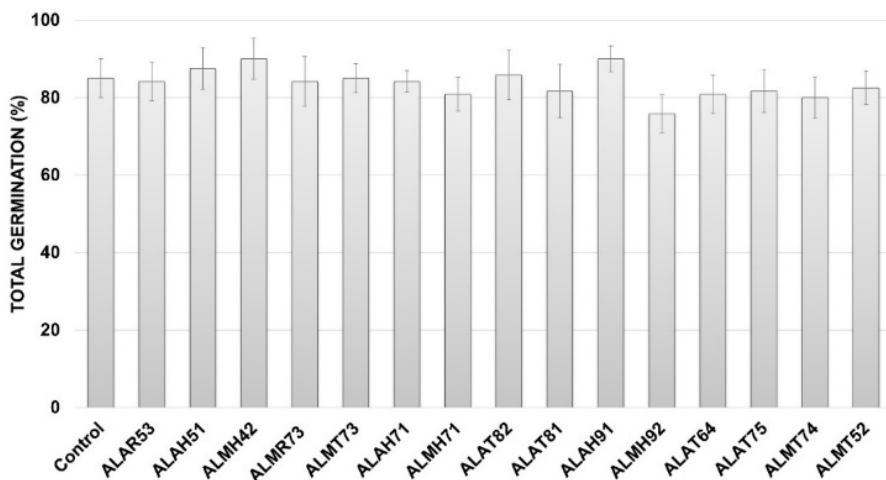
Cepas con efecto antagonista observado contra *Aspergillus* spp. se utilizaron en un experimento de germinación para determinar el efecto de las bacterias sobre la germinación total, la longitud y la producción de biomasa de las plántulas de albahaca. La germinación total de la semilla alcanzó entre el 80 y el 90 %. La Figura 2 muestra que todas las bacterias probadas no presentaron diferencias significativas en la germinación total de semillas de albahaca en comparación con el control. Otros informes sobre el tratamiento de semillas de *Capsicum annuum* con *B. amyloliquefaciens* dieron como resultado un aumento máximo de la germinación de las semillas (84,75 %), el vigor de las plántulas (1.423,8) junto con un aumento de los parámetros de crecimiento vegetativo (Gowtham *et al.*, 2018). Recientemente, se aplicó un enfoque basado en secuenciación de próxima generación independiente del cultivo para investigar el impacto beneficioso de *B. amyloliquefaciens* L-S60 en la composición y dinámica de la microbiota de la rizosfera y las condiciones de crecimiento de los pepinos durante la plántula en cepellón. La aplicación de L-S60 alteró significativamente la estructura de la comunidad bacteriana asociada con la plántula de pepino. La presencia de especies beneficiosas de la rizosfera como *Bacillus*, *Rhodanobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Nonomuraea* y *Agrobacterium* fue mayor con el tratamiento con L-S60 que en el grupo control (Qin *et al.*, 2017).

higher upon L-S60 treatment than in the control group (Qin *et al.*, 2017).

Likewise, hypocotyl (figure 3A) and radicle (figure 3B), dry biomass accumulation did not show any statistically significant difference among groups upon inoculation with isolated antagonistic strains. It is important to highlight that seedlings were analyzed at early stages of growth; in future experiments, the impact of these strains on morphometric characteristic of later stages of development will be carried out. Although, there were no statistically significant differences between treatments, a tendency to increase the dry weight can be observed in the hypocotyl with ALAT81 and ALMT74 and in radicle with ALMH71 and ALMT74.

In terms of radicle length, ALAH51, ALMR73, ALMT52, ALAT64, ALMH71, ALMH42, ALAH91 and ALMH92 were statistically equivalent as compared to the control. These observations indicate that the interaction of the mentioned bacteria strains above did not affect radicle growth during early seedling development. However, the rest of the isolated strains tested had negative effects, some of them at higher extend like ALMT73 and ALAT81. On the other hand, hypocotyl length did not show statistically significant difference of any of the treatments as compared to the control (table 4).

Further experimentations will be carried out to find out if these *Bacillus* species strains show antagonistic activities against other important phytopathogens if they have an impact on basil growth and quality in terms



**Figura 2.** Porcentaje de germinación total de plántulas de albahaca tratadas con la bacteria aislada de albahaca que presentó actividad antagonista contra *Aspergillus* spp. después de la incubación durante 5 días a  $25 \pm 1$  °C, 80 % de humedad y en la oscuridad. Los valores presentados son media  $\pm$  desviación estándar. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos  $p > 0,05$ .

**Figure 2.** Total germination percentage of basil seedlings treated with the isolated bacteria from basil that presented antagonistic activity against *Aspergillus* spp. after incubation for 5 days at  $25 \pm 1$  °C, 80 % humidity and in the dark. Values presented are mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant difference among treatments was observed  $p > 0.05$ .

Asimismo, la acumulación de biomasa seca en hipocótilo (figura 3A) y radícula (figura 3B), no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos tras la inoculación con cepas antagonistas aisladas. Es importante resaltar que las plántulas se analizaron en etapas tempranas de crecimiento; en experimentos futuros, se llevará a cabo el impacto de estas cepas en las características morfométricas de

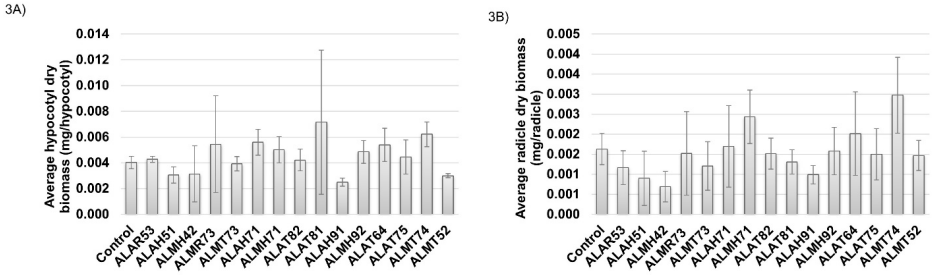
of essential oil and other desirable traits. Moreover, these strains could be used for inoculation of other plants to investigate their biotechnological potential.

## Conclusion

To our knowledge this is the first time that *B. amyloliquefaciens* strains have been isolated from basil

etapas posteriores de desarrollo. Si bien no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, se puede observar una tendencia a aumentar el peso seco en el hipocótilo con ALAT81 y ALMT74 y en la radícula con ALMH71 y ALMT74.

cultivars. The biotechnological use of these bacteria to protect basil plants against fungi is a sustainable and reliable option to reduce crop loss due to fungi incidence. Furthermore, these bacteria are remarkable allies for basil plant development due to their ability



**Figura 3. Acumulación promedio de biomasa seca de hipocótilo (A) y radícula (B) por plántula de albahaca cultivada después de la inoculación de las semillas con las bacterias aisladas e incubadas durante 5 días a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 80 % de humedad y en la oscuridad. Los valores presentados son media  $\pm$  desviación estándar. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos  $p > 0,05$ .**

**Figure 3. Average hypocotyl (A) and radicle (B) dry biomass accumulation per basil seedling grown after seeds inoculation with the isolated bacteria and incubated for 5 days at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 80 % humidity and in the dark. Values presented are mean  $\pm$  standard deviation. No statistically significant difference among treatments was observed  $p > 0.05$ .**

En términos de longitud de radícula, ALAH51, ALMR73, ALMT52, ALAT64, ALMH71, ALMH42, ALAH91 y ALMH92 fueron estadísticamente equivalentes en comparación con el control. Estas observaciones indican que la interacción de las cepas de bacterias

to colonize them without damage. The investigation carried out and presented here in establishes the basis for further studies on agronomic useful these *Bacillus* strains that are naturally occurring in basil plants around La Paz, Baja California Sur, Mexico, where we

mencionadas anteriormente no afectó el crecimiento de la radícula durante el desarrollo temprano de las plántulas. Sin embargo, el resto de las cepas aisladas ensayadas tuvieron efectos negativos, algunos de ellos en mayor extensión como ALMT73 y ALAT81. Por otro lado, la longitud del hipocótilo no mostró una diferencia estadísticamente significativa de ninguno de los tratamientos en comparación con el control (tabla 4).

can find very distinctive environmental conditions like extreme temperatures, high soil salinity and drought.

### Acknowledgments

This work was supported by the Department of Agronomy at the Universidad Autónoma de Baja California Sur. Authors are thankful to Yozitlali Villavicencio-Velázquez

### Cuadro 3. Longitudes de radícula e hipocótilo de plántulas de albahaca de 5 días tratadas con la bacteria aislada que presentó actividad antagonista contra *Aspergillus* spp. incubados a $25 \pm 1$ °C, 80 % de humedad y en la oscuridad.

**Table 3. Radicle and hypocotyl lengths of 5-day old basil seedlings treated with the isolated bacteria that presented antagonistic activity against *Aspergillus* spp. incubated at  $25 \pm 1$  °C, 80 % humidity and in the dark.**

Treatment	Average length (mm)	
	Radicle	Hypocotyl
Control	19.43 <sup>a</sup> ± 8.68	13.25 <sup>abcde</sup> ± 4.26
ALAR53	15.10 <sup>ede</sup> ± 7.71	12.08 <sup>de</sup> ± 5.14
ALAH51	19.17 <sup>ab</sup> ± 8.48	11.61 <sup>de</sup> ± 4.01
ALMH42	16.50 <sup>abcde</sup> ± 8.08	10.92 <sup>e</sup> ± 4.45
ALMR73	18.56 <sup>abc</sup> ± 8.88	13.65 <sup>abcd</sup> ± 5.32
ALMT73	10.99 <sup>f</sup> ± 5.49	12.38 <sup>de</sup> ± 4.49
ALAH71	13.92 <sup>def</sup> ± 6.31	14.66 <sup>ab</sup> ± 5.09
ALMH71	16.85 <sup>abcde</sup> ± 7.34	14.98 <sup>a</sup> ± 4.44
ALAT82	15.27 <sup>ede</sup> ± 7.22	13.80 <sup>abcd</sup> ± 4.55
ALAT81	10.19 <sup>f</sup> ± 4.48	12.31 <sup>ede</sup> ± 4.28
ALAH91	16.42 <sup>abcde</sup> ± 8.83	13.79 <sup>abcd</sup> ± 5.17
ALMH92	15.58 <sup>abcde</sup> ± 7.22	14.19 <sup>abc</sup> ± 3.94
ALAT64	16.97 <sup>abcde</sup> ± 9.14	12.62 <sup>abcde</sup> ± 3.85
ALAT75	15.35 <sup>bcde</sup> ± 9.29	12.58 <sup>bcde</sup> ± 4.88
ALMT74	13.07 <sup>ef</sup> ± 7.33	12.98 <sup>abcde</sup> ± 6.06
ALMT52	17.10 <sup>abcd</sup> ± 7.59	14.77 <sup>ab</sup> ± 4.90

a, b, c, d, eValores presentados son la media ± desviación estándar. Una letra diferente en la misma columna representa una diferencia estadísticamente significativa  $p \leq 0,05$

a, b, c, d, eValues presented are mean ± standard deviation. Different letter at the same column represents statistically significant difference  $p \leq 0.05$ .

En futuros experimentos se ensayará si estas cepas de especies de *Bacillus* muestran actividades antagónicas contra otros fitopatógenos importantes si tienen un impacto en el crecimiento y la calidad de la albahaca en términos de aceite esencial y otros rasgos deseables. Además, estas cepas podrían usarse para la inoculación de otras plantas para investigar su potencial biotecnológico.

## Conclusión

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se han aislado cepas de *B. amyloliquefaciens* de cultivares de albahaca. El uso biotecnológico de estas bacterias para proteger las plantas de albahaca contra los hongos es una opción sostenible y confiable para reducir la pérdida de cultivos debido a la incidencia de hongos. Además, estas bacterias son aliadas notables para el desarrollo de las plantas de albahaca debido a su capacidad para colonizarlas sin dañarlas. La investigación realizada y presentada aquí sienta las bases para futuros estudios sobre la utilidad agronómica de estas cepas de *Bacillus* que se encuentran naturalmente en plantas de albahaca alrededor de La Paz, Baja California Sur, México, donde se pueden encontrar condiciones ambientales muy distintivas como temperaturas extremas, altas temperaturas, salinidad del suelo y sequía.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Agronomía de

and José Enrique Amador-Sánchez for technical support.

## *End of English Version*

la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Los autores agradecen a Yozitlali Villavicencio-Velázquez y José Enrique Amador-Sánchez por el apoyo técnico.

## Literatura citada

- Adamović, D., I. Dalović and N. Mrkovački. 2015. Microbial abundance in rhizosphere of medicinal and aromatic plant species in conventional and organic growing systems. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 52: 1-6. <https://cutt.ly/znRmI20>
- Banchio, E., X. Xie, H. Zhang, and P. W. Paré. 2009. Soil bacteria elevate essential oil accumulation and emissions in sweet basil. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 653-657. <https://cutt.ly/znRmSq2>
- Broda, D.M., P.A. Lawson, R.G. Bell and D.R. Musgrave. 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1539-1550. <https://cutt.ly/snRmDTh>
- Chen, X. H., A. Koumoutsis, R. Scholz, and R. Borriss, 2009. More than anticipated - production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 14-24. <https://cutt.ly/4nRmHmY>
- Daungfu, O., S. Youpensuk and S. Lumyong. 2019. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of Citrus Canker in lime plants. *Tropical Life Sciences Research*, 30: 73-88. <https://cutt.ly/nnRmKkq>
- Gilardi, G., S. Demarchi, A. Garibaldi, and M. L. Gullino. 2013. Management of downy mildew of sweet basil

- (*Ocimum basilicum*) caused by *Peronospora belbahrii* by means of resistance inducers, fungicides, biocontrol agents and natural products. *Phytoparasitica*, 41: 59-72. <https://cutt.ly/4nRmL64>
- Goldman, E. and L.H. Green (Ed.) 2009. *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition. 2nd ed. London, pp.3-63. ISBN 978-0-8493-9365-5
- Gowtham, H.G., M. Murali, S. B.Singh, T. R. Lakshmeesha, K.Narasimha Murthy, K. N. Amruthesh and S. R. Niranjana. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. *BIOL CONTROL.*, 126: 209-217. <https://cutt.ly/QnRmC4n>
- Hernández-Montiel, L.M., T. Rivas-García, M. Romero-Bastidas, C. J. Chiquito-Contreras, F. H. Ruiz-Espinoza and R. G. Chiquito-Contreras. 2018. Potencial antagonico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Rev. Mexicana cienc. agric.*, 20: 4311-4321. <https://cutt.ly/JnRmBDJ>
- Jacobs, J.L., T. L. Carroll and G. W. Sundin, 2005. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microb. Ecol.* 49: 104-113. <https://cutt.ly/CnRmN5H>
- Joo, H.J., H.Y. Kim, L.H. Kim, S.Lee, J.G. Ryu, and T.A. Lee, 2015. *Brevibacillus* sp. antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *BIOL CONTROL.*, 87: 64-70. <https://cutt.ly/enRm2fT>
- Kim, M.J., R. Radhakrishnan, S.M. Kang, Y.H. You, E.J. Jeong, J.G. Kim and I.J. Lee, 2017. Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23: 571-580. <https://cutt.ly/TnRm9LI>
- Liu, Z., A. Budiharjo, P. Wang, H. Shi, J. Fang, R. Borriss, K. Zhang, and X. Huang, 2013. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 10081-10090. <https://cutt.ly/bnRm8th>
- Lugtenberg, B. and F. Kamilova. 2005. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63, 541-556. <https://cutt.ly/jnRm40B>
- Moffat, A.S. 2001. Finding new ways to fight plant diseases. *Science*, 292: 2270-2273. <https://cutt.ly/nnRm6p0>
- Pieterse, C. M. J., C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. M. Van Wees and P. A. H. M. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol*, 52: 347-375. <https://cutt.ly/DnRQqHm>
- Pound, M., A. French, J. Atkinson, D. Wells, M. Bennett and T. Pridmore, 2013. RootNav: Navigating Images of Complex Root Architectures. *Plant Physiology*, 162: 1802-1814. <https://cutt.ly/snRQeXx>
- Purahong, W., L. Orrù, I. Donati, G. Perpetuini, A. Cellini, A. Lamontanara, V. Michelotti, G. Tacconi, and F. Spinelli. 2018. Plant microbiome and its link to plant health: host species, organs, and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* infection shaping bacterial phyllosphere communities of kiwifruit plants. *Front Plant Sci*, 9: 1563. <https://cutt.ly/EnRQpyM>
- Qin, Y., Q. Shang, Y. Zhang, P. Li and Y. Chai, 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 reforms the rhizosphere bacterial community and improves growth conditions in cucumber plug seedling. *Front Microbiol*, 8: 2620. <https://cutt.ly/CnRQfcV>
- Raaijmakers, J. M., I. De Bruijn, O. Nybroe and M. Ongena. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 1037-1062. <https://cutt.ly/qnRQhPj>
- Rabbee, M. F., M. S. Ali, J. Choi, B. S. Hwang, S. C. Jeong and Baek K. 2019. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within



- plant microbiomes. *Molecules*, 24: 1046. <https://cutt.ly/5nRQjB6>
- Rios-Velasco, C., J. N. Caro-Cisneros, D. I. Berlanga-Reyes, M. F. Ruíz-Cisneros, J. J. Ornelas-Paz, M. A. Salas-Marina, E. Villalobos-Pérez and V. M. Guerrero-Prieto, 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 34: 84-99. <https://cutt.ly/InRQHUE>
- Statistical Analysis System (SAS) Software, University Edition; Retrieved May 2, 2020, from. <https://cutt.ly/tnRQLDq>
- Smith, D. L., Praslickova, D., & Ilangumaran, G. 2015. Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Front Plant Sci*, 6: 722. <https://cutt.ly/CnRQCVT>