

# Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology

## Potencial de las ciencias ómicas en la bioprospección de agentes microbianos de control biológico: el caso de la agro-biotecnología mexicana

**Liliana Carolina Córdova-Albores**, Escuela de Agronomía, Universidad De La Salle Bajío, Avenida Universidad 602. Colonia Lomas del Campestre C.P. 37150, León, Guanajuato; **Lily Xochilt Zelaya-Molina**, <sup>1</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP. Boulevard de la Biodiversidad # 400. Rancho Las Cruces. C.P. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco; **Norma Ávila-Alistac**, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960, CDMX, México; **Valeria Valenzuela-Ruíz**, <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, C.P. 85000. Ciudad Obregón, Sonora; **Nelly Ethel Cortés-Martínez**, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara. Avenida Rafael Casillas Aceves No. 1200, Tepatitlán de Morelos, Jalisco; **Fannie Isela Parra-Cota**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP, Norman E. Borlaug Km. 12, C.P. 85000, Ciudad Obregón, Sonora; **Yamily Yazmin Burgos-Canul**, INECOL, Carretera antigua a Coatepec 351, Colonia El Haya. C.P. 91073, Xalapa-Enríquez, Veracruz; **Ismael Fernando Chávez-Díaz**; **Marja Liza Fajardo-Franco**, Posgrado en Manejo Sustentable de Recursos Naturales, Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Calle Principal a Lipuntahuaca S/N, Lipuntahuaca, CP 73475, Huehuetla, Puebla; **Sergio de los Santos-Villalobos\***.

\*Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

**Recibido:** 20 de Septiembre, 2020.

**Aceptado:** 21 de Diciembre, 2020.

Córdova-Albores LC, Zelaya-Molina LX, Ávila-Alistac N, Valenzuela-Ruíz V, Cortés-Martínez NE, Parra-Cota FI, Burgos-Canul YY, Chávez-Díaz IF, Fajardo-Franco ML and de los Santos-Villalobos S. 2021. Omics sciences potential on bioprospecting of biological control microbial agents: the case of the Mexican agro-biotechnology. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 147-184.  
**DOI:** <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-3>

Primera publicación en línea: 29 de Diciembre, 2020.  
First published on line: December 29, 2020.

**Abstract.** At present, studies of biological control agents of microbial origin (BCA-M) have mainly focused on their taxonomic characterization, through the use of conventional molecular markers, and the *in vitro* evaluation of modes of action, or under greenhouse conditions, but limitedly under field conditions. Furthermore, recent bioprospecting studies of BCA of microbial origin mainly focus on *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Pseudomonas*, and *Bacillus*. Even when the research developed in Mexico on this topic has

**Resumen.** Actualmente, los estudios sobre agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) generalmente están enfocados en la caracterización taxonómica mediante el uso de marcadores moleculares convencionales y en evaluar la capacidad antagonista/mecanismos de acción *in vitro*, en invernadero y eventualmente bajo condiciones de campo. Los ACB-M se centran principalmente en cepas de *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Beauveria*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Aunque la investigación en México en este campo ha sido muy activa en los últimos años, el desarrollo e innovación de una mayor diversidad de bioplaguicidas registrados y comercializados puede ser potenciada. En este contexto, el uso de técnicas vanguardistas en la era de las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, y metabolómica) enfocadas a la correcta afiliación taxonómica de los ACB-M y en el estudio de mecanismos de acción y comportamiento agroecológico es determinante para la bioprospección y uso extensivo de estos ACB-M de manera eficaz, biosegura y costo-efectiva. En el marco de la celebración internacional de la sanidad vegetal, la presente revisión analiza críticamente el estado del conocimiento y de aquellos aspectos que limitan la bioprospección y el uso extensivo de ACB-M con énfasis en México, desde la aplicación de las ciencias ómicas para la identificación, selección y estudio de los mecanismos de acción de dichos agentes hasta la difusión y socialización del conocimiento científico generado. Se pretende promover la reflexión sobre este campo del conocimiento e incentivar la nueva generación ACB-M con una visión holística y sistémica en beneficio de una agricultura sustentable y resiliente.

**Palabras clave:** Bioplaguicidas, taxonomía, genómica, transcriptómica, metabolómica.

been active during the last years, the development and innovation of greater variety of registered and currently commercialized biopesticides need to be improved. In this context, the use of cut-edge techniques in the era of omics sciences (genomics, transcriptomics, and metabolomics) focused on the correct taxonomic affiliation of BCA-M, as well as their modes of action and ecology in agroecosystems, will expand the bioprospecting and extensive use of these BCA in a more efficient, biosafety, and cost-effective manner. In the framework of the international celebration of plant health, this review critically analyzes the knowledge status of the aspects that limit the bioprospecting and extensive use of BCA-M, mainly in Mexico, from the application of omics sciences for the identification, selection, and study of action mechanisms of those agents until the dissemination and socialization of the generated scientific knowledge. The foregoing is intended to promote reflection on this field of knowledge and encourage the new generation BCA-M with a holistic and systemic vision for the benefit of sustainable and resilient agriculture.

**Key words:** Bioplaguicidas, taxonomy, genomic, transcriptomic, metabolomic.

Crops are exposed to abiotic and biotic factors that can negatively impact their productivity, *i.e.*, floods, droughts, degraded soils, and phytopathogens. Phytopathogens are responsible for up to 40 % of crop yield reductions (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). Along with this, the growing demand for food fueled by population increases has led to the modification of agricultural practices to mitigate the losses caused by phytopathogens,

Los cultivos agrícolas están expuestos a factores abióticos y bióticos que pueden incidir negativamente en su productividad, *i.e.* inundaciones, sequías, suelos degradados y fitopatógenos. Estos últimos causan una disminución del rendimiento agrícola hasta del 40% (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). Aunado a esto, el aumento poblacional y -en consecuencia- la creciente demanda de alimentos condujeron a la modificación de las prácticas agrícolas para mitigar las pérdidas ocasionadas por la incidencia de fitopatógenos, sin disminuir la calidad nutricional y la inocuidad de los alimentos producidos (FAO, 2018). La estrategia ampliamente utilizada para atender estos aspectos ha sido la aplicación de plaguicidas sintéticos, la cual aumentó mundialmente un 97.7% de 1992 (1.30 kg ha<sup>-1</sup>) a 2016 (2.57 kg ha<sup>-1</sup>) (FAO, 2018); mientras que en México el incremento de fungicidas sintéticos fue 76.9% (de 1.08 a 1.91 kg ha<sup>-1</sup>) en el mismo periodo (Roser, 2019). Se ha reportado que sólo el 0.1% de los plaguicidas sintéticos aplicados llega al cultivo agrícola de interés (Gill y Garg, 2014), lo cual genera graves afectaciones económicas y ambientales, como la contaminación de suelos y mantos acuíferos con residuos recalcitrantes, la degradación química y microbiana del suelo y la pérdida de su biodiversidad (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

En este contexto, el manejo de fitopatógenos en los sistemas de producción agrícola debe ser atendido amplia e integralmente en congruencia con el objetivo dos, poner fin al hambre, de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible para América Latina y el Caribe. En éste se establece la necesidad de centrar esfuerzos para lograr la seguridad alimentaria, mejorar la nutrición y promover una agricultura sostenible (ONU, 2018). México ha coadyuvado a estos objetivos colateralmente ya que desde 1940 se iniciaron los primeros estudios y aplicaciones del control biológico y se crearon

without lowering the nutritional quality and safety of the products grown (FAO, 2018). A widely used strategy to address these aspects has been the use of synthetic pesticides, which increased 97.7% worldwide from 1992 (1.30 kg ha<sup>-1</sup>) to 2016 (2.57 kg ha<sup>-1</sup>) (FAO, 2018); in Mexico, the use of synthetic fungicides increased 76.9% (from 1.08 to 1.91 kg ha<sup>-1</sup>) in the same period (Roser, 2019). Reports show that only 0.1% of the applied synthetic pesticides reach the crop of interest (Gill and Garg, 2014), a fact that creates serious economic and environmental impacts, such as soil and aquifer contamination with recalcitrant wastes, soil, chemical, and microbial degradation, and biodiversity loss (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

In this context, phytopathogen management in cropping systems must be extensively and comprehensively addressed to be consistent with Goal 2, end hunger, of the 2030 Agenda for the Sustainable Development for Latin America and the Caribbean. Goal 2 establishes the need to concentrate efforts to achieve food security, improve nutrition, and promote sustainable agriculture (ONU, 2018). Mexico has collaterally contributed to these goals since 1940 when the first studies and applications of biological control began and academic programs were established to promote an integrated plant health management (Gutiérrez-Samperio, J. Personal communication. 2019). Biological management of phytopathogens is defined as “the use of beneficial organisms to reduce the negative effects caused by phytopathogens, through their antagonistic actions, either by direct actions of gene recognition or indirectly through metabolites or products derived from them” (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). In a broader sense, biological management was initially promoted through campaigns implemented by government agencies, where predator insects, parasitoids or

programas académicos con el fin de promover el manejo integrado fitosanitario (Gutiérrez-Sampeiro, J. Comunicación Personal. 2019). El manejo biológico de fitopatógenos es definido como “el uso de organismos benéficos para reducir los efectos negativos de patógenos de las plantas, a través de sus acciones antagónicas, ya sea por acción directa de reconocimiento génico, o indirectamente mediante metabolitos o productos derivados de éstos” (Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2020). En una concepción amplia, el manejo biológico se incentivó inicialmente con campañas implementadas por instancias gubernamentales, mediante el uso de insectos depredadores, parasitoides o insectos estériles; y posteriormente, con la inclusión de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium*), hongos filamentosos y bacterias, para el control de plagas de importancia nacional (Arredondo-Bernal y Rodríguez-del Bosque, 2015).

El uso de agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) en México es una alternativa que ha sido utilizada para complementar el control convencional de fitopatógenos, mediante plaguicidas sintéticos (Arredondo-Bernal y Rodríguez-del Bosque, 2015). Por ejemplo, en 2017 en México, el área de siembra fue aproximadamente de 32.4 millones de hectáreas, cuyos principales cultivos fueron: maíz, sorgo, frijol, café, caña de azúcar y trigo (INEGI, 2017); en dichos cultivos los principales géneros de fitopatógenos reportados fueron *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Pseudomonas*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Leifsonia* y *Xanthomonas*, y los ACB-M más utilizados para controlar a estos fitopatógenos fueron las especies fúngicas *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseus* y *Beauveria bassiana*, y las especies bacterianas *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis* (García-Juárez *et al.*, 2016; Villarreal-Delgado *et*

sterile insects were used, followed by the inclusion of entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium*), filamentous fungi and bacteria, to control important pests nationally (Arredondo-Bernal and Rodríguez-del Bosque, 2015).

The use of biological control agents of microbial origin (BCA-M) in Mexico is an alternative to complement the conventional control of phytopathogens using synthetic pesticides (Arredondo-Bernal and Rodríguez-del Bosque, 2015). For example, in Mexico, the area sown in 2017 was approximately 32.4 million hectares, where the main crops were maize, sorghum, bean, coffee, sugarcane, and wheat (INEGI, 2017); the main phytopathogen genera reported in those crops were *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Pseudomonas*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Leifsonia*, and *Xanthomonas*, and the BCA-M that were most used for controlling these pathogens were the fungal species *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*, and the bacterial species *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* and *B. thuringiensis* (García-Juárez *et al.*, 2016; Villarreal-Delgado *et al.*, 2017; Delgado-Ortiz *et al.*, 2019). Although researches on BCA are significant (Tables 1 and 2), sometimes, no detailed information on the results of their application to nationally important crops in the field are published or are included in technical reports with restricted access and limited to describing crop yield increases and/or phytopathogen inhibition.

Identifying new agents and/or understanding the plant-pathogen-BCA of microbial origin interaction (under field conditions), as well as conducting robust studies of the polyphasic taxonomic affiliation (consensus classification based on the integration of all available phenotypic and genotypic data), action and ecology mechanisms of those BCA in

*al.*, 2017; Delgado-Ortiz *et al.*, 2019). Aunque la investigación en ACB es significativa (Cuadro 1 y 2), en ocasiones, la información detallada sobre los resultados obtenidos por la aplicación en campo de estos ACB a cultivos agrícolas de importancia nacional no es publicada o se registra en informes técnicos con acceso restringido, y se limita a describir aumentos de rendimientos agrícolas y/o inhibición de fitopatógenos.

El descubrimiento de nuevos agentes y/o el entendimiento de las interacciones planta-patógeno-ACB de origen microbiano (bajo condiciones de campo), así como estudios robustos sobre la afiliación taxonómica polifacética (clasificación consenso basada en la integración de todos los datos fenotípicos y genotípicos disponibles), los mecanismos de acción y ecología de dichos ACB en los agroecosistemas, mediante el empleo de los avances recientes de las ciencias ómicas, es determinante para el registro, comercialización, innovación y éxito de bioplaguicidas formulados. Por lo anterior, el objetivo de la presente revisión es describir el estado del conocimiento y analizar, en el marco de la celebración internacional de la Sanidad Vegetal, aspectos que limitan la bioprospección y uso extensivo de ACB-M en México, así como estrategias genómicas de vanguardia inherentes a las ciencias ómicas enfocadas a la identificación, selección y estudio de los mecanismos de acción de dichos agentes, así como la difusión y socialización del conocimiento científico generado para potenciar la innovación agro-biotecnológica y el éxito de bioplaguicidas.

**Agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) y bioplaguicidas en México.** La búsqueda e introducción de enemigos naturales a fitopatógenos de importancia económica en México tomó relevancia a partir de la década de 1940, debido a la necesidad de generar estrategias de

the agroecosystems, using the recent advances in omics sciences, are essential for registration, marketing, innovation and success of formulated biopesticides. For this reason, in the framework of the international celebration of Plant Health, the objective of this review is to describe the knowledge status and analyze the aspects which limit the bioprospection and extensive use of BCA-M in Mexico, cutting-edge genomic strategies inherent to the omics sciences focused on the identification, selection and study of the mechanisms of action of those agents, and the dissemination and socialization of the scientific knowledge gained to enhance agro-biotechnological innovation and biopesticides success.

**Biological control agents of microbial origin (BCA-M) and biopesticides in Mexico.** The identification and introduction of natural enemies in economically important phytopathogens in Mexico became relevant in the 1940s due to the need to develop efficient and sustainable management strategies. In the more than 80 years of using BCA-M in our country (Bernal and Quezada, 1999), 230 bioproducts from 40 companies registered by COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>) are available in the national market. However, some of these products have a limited number of active ingredients at the taxonomic group level (fungi, bacteria y/o viruses), or microbial genus/species for controlling the causal agents of diseases in plants that are cultivated in Mexico (Table 1). This reflects a limited availability of bioproducts to be used in the Mexican fields despite the efforts made and the research conducted in our country. This fact could be associated with the limited support to the scientific sector to conduct systemic research, bioprospecting new BCA-M, and obtaining patent registration of biotechnological products, as well as with the limited organizational structure at



**Cuadro 1. Productos de control biológico de origen microbiano en México con registro ante COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>).**

**Table 1. Biological control products of microbial origin in Mexico, registered by COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>).**

Ingrediente Activo	Producto comercial	Uso agrícola
<b>Bacterias</b>		
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	Q-Bacter	Bio-bactericida
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Serifel/Serenade Optimum / Stargus	Bio-fungicida
<i>B. subtilis</i>	Fungifree-Ab/ Agrobacilo/ Serenade As/ Serenade Max/ Bacillios G / Baktillis / Serenade/ Rador/ Vici Active/ Fungi-Q/ Fungisei/ Protec-Root/ Cx-9030	Bio-fungicida
<i>B. stearothermophilus</i>	Bacillus 1537 / Labsa Bst / Bacillus Thermo	Bio-fungicida
<i>B. thuringiensis</i>	Dipel 2x /Xentari Grd/ Delta Bt/ Bt-K/ Dipel-2x/ Phc Beretta/ Larvix/ Thuricide Ph/ Newbt-2x Wp/ Myp/ Xentari/ Lepinox 15 Wdg/ Crymax Gda/ Phc Condor Wp/ Dipel 2x/ Turinsil	Bio-insecticida
<i>B. pumilus</i>	Sonata As	Bio-fungicida
<i>Chromobacterium subsugae</i>	Grandevo	Bio-insecticida
<i>Streptomyces</i> spp.	Blite Free	Bio-fungicida
<b>Hongos</b>		
<i>Beauveria bassiana</i>	Bea-Sin/ Atento/ Bioin Dalife/Cercon Es/ Naturalis L	Bio-insecticida
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Meta-Sin/ Biomett/ Meta-Noc/ Spectrum Meta	Bio-insecticida
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Ditera Es/ Ditera Df	Bio-nematicida
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Pae-Sin/ Bioamin-Insect-1/ Pfr-97 20% Wdg/ Nofly Wp	Bio-insecticida
<i>P. lilacinus</i>	Lila-Sin / Chimal/ Bioact Wg/ Biostat/ Nemaфин/ Spectrum Pae	Bio-nematicida
<i>P. variotii</i>	Nemaquim / NemaKill / Pha.Da / Nem P.B. / Sinnemakill / Nemphada / O.B Golf	Bio-nematicida
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Genexis Ph	Bio-nematicida
<i>Trichoderma harzianum</i>	Tricho-Sin/ Labrador/ Trianum P/ Phc T22/ Spectrum Trico-Bio/ Bioamin-Fung-2/ Rootshield Plus Wp	Bio-fungicida
<i>T. lignorum</i>	Mycobac	Bio-fungicida
<i>T. viride</i>	Funqui	Bio-fungicida
<i>Verticillium lecanii</i>	Verti-Sin/ Eday	Bio-insecticida
<b>Mezclas</b>		
<i>Bacillus subtilis, Rhodotorula minuta</i>	Fungifree-Ab Plus	Bio-fungicida
<i>B. subtilis, Bacillus</i> spp. <i>Torulopsis inconspicua</i>	Obiettivo	Bio-fungicida
<i>B. licheniformis, T. harzianum</i>	Biowall	Bio-fungicida
<i>Bacillus</i> spp., aceite de clavo y neem	Roya Out	Bio-fungicida
<i>B. subtilis, Trichoderma</i> spp., <i>P. lilacinus</i> , quitosano, bicarbonato de potasio	Nemaxxion Biol	Bio-fungicida
<i>B. bassiana, Nomurea rileyi</i> , aceite de neem, <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> y var. <i>Israelensis</i>	Larbiol 2X	Bio-insecticida
<i>B. bassiana, Nomurea rileyi, Metarhizium anisopliae, Verticillium lecanii, P. fumosoroseus</i> , concentrado oleico	Biomaxx Duo	Bio-insecticida
<i>T. harzianum, T. viride, T. fasciculatum</i>	Juq	Bio-fungicida
<i>P. fumosoroseus, M. anisopliae, B. bassiana</i>	Tri-Sin	Bio-insecticida
<i>M. anisopliae, B. bassiana</i>	Biomabb/ QUIM	Bio-insecticida
<i>P. lilacinus, B. firmus</i>	Arrecife	Bio-nematicida
<i>P. lilacinus, B. subtilis, Pseudomonas fluorescens</i> , extracto de ruezno de nuez, <i>Yucca schidigera</i> , guiche de lechuguilla, cáscara de nuez, higuera, gel de nopal, chitosan	Nemmax	Bio-nematicida

manejo eficientes y sostenibles. En más de 80 años del empleo de ACB-M en nuestro país (Bernal y Quezada, 1999), en el mercado nacional se encuentran disponibles 230 bioproductos de 40 empresas con registro ante COFEPRIS (<https://www.gob.mx/cofepris>). Sin embargo, entre estos productos existe un número limitado de ingredientes activos a nivel de grupo taxonómico (hongos, bacterias y/o virus), género o especie microbiana para el control de agentes causales de enfermedades de plantas cultivadas en México (Cuadro 1). Lo anterior refleja una limitada disponibilidad de bioproductos para su uso en el campo mexicano a pesar de los esfuerzos e investigaciones realizadas en nuestro país. Esto podría estar asociado al limitado apoyo otorgado al sector científico para la investigación sistémica y bioprospección de nuevos ACB-M; para el registro de patentes en el área biotecnológica, así como a la escasa estructura organizacional a nivel institucional para establecer departamentos especializados en el proceso de patentes y licenciamiento. Los escasos recursos financieros muchas veces han implicado el desarrollo de investigaciones parciales, principalmente *in vitro*, a partir de colecciones con limitada representatividad biológica y regional. Por otra parte, no se cuenta con acceso a la información documental que soporte científicamente su efectividad, y se tiene una deficiencia de datos estadísticos relativos a su producción, consumo y éxito a nivel nacional (De León y Mier, 2010); a excepción de productos como Fungifree®, el cual es un biofungicida efectivo para el manejo de enfermedades foliares como la antracnosis (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. fragariae*), cenicilla polvorienta (*L. taurica*, *E. chichoracearum* y *S. humili*) y moho gris (*B. cinerea*) (Galindo *et al.*, 2015), y los trabajos realizados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico SAGARPA-DGSV para el manejo de *Diaphorina citri* y langosta con hongos entomopatógenos (Ayala-Zermeño *et al.*, 2015; Gallou *et al.*, 2016).

the institutional level to establish departments specialized in patent and licensing processes. The lack of financial resources has often impacted the development of partial research, mainly *in vitro*, from collections with limited biological and regional representation. On the other hand, there is no access to documentary information to scientifically support their effectiveness, nor statistical data of their production, consumption and success at the national level (De León and Mier, 2010), with the exception of products such as Fungifree®, which is an effective biofungicide for managing foliar diseases such as anthracnose (*C. gloeosporioides*, *C. acutatum* and *C. fragariae*), powdery mildew (*L. taurica*, *E. chichoracearum* and *S. humili*) and gray mold (*B. cinerea*) (Galindo *et al.*, 2015), and the studies conducted by Centro Nacional de Referencia de Control Biológico SAGARPA-DGSV for controlling *Diaphorina citri* and lobster with entomopathogenic fungi (Ayala-Zermeño *et al.*, 2015; Gallou *et al.*, 2016).

Furthermore, one of the main constraints for technology transfer and extensive use of bioproducts based on BCA-M is the insufficient publication and dissemination of scientific research conducted by different universities and research centers in the country, even after the product's patent has been obtained (Bernal and Quezada, 1999). In this regard, the important role of the Mexican Journal of Phytopathology or RMF, for its acronym in Spanish (<https://www.rmf.smf.org.mx/>), must be recognized, because during the past eight years, different researchers have published about 50 scientific papers (23.7% of the total number of the published articles) reporting aspects related to the use of BCA-M, *i.e.*, scientific articles, review articles, phytopathological notes and phytopathological reports (Table 2). Likewise, records provided by Scielo Analytics (<https://analytics.scielo.org/>) show that of the 100 articles of the JMP that are most consulted online, 24%

Además, una de las principales limitantes para la transferencia de tecnología y uso extensivo de bioproductos a base de ACB-M es la insuficiente publicación y difusión de las investigaciones científicas desarrolladas por diversas universidades y centros de investigación del país, aún posterior al registro de la patente en cuestión (Bernal y Quezada, 1999). Al respecto, es de reconocer el importante papel de la Revista Mexicana de Fitopatología (<https://www.rmfm.smf.org.mx/>), ya que en los últimos ocho años diversos investigadores han publicado alrededor de 50 contribuciones (23.7% de su publicación total) sobre aspectos relacionados al uso de ACB-M, *i.e.* artículos científicos, artículos de revisión, notas fitopatológicas y reportes fitopatológicos (Cuadro 2). Así mismo, se ha registrado por Scielo Analytics (<https://analytics.scielo.org/>) que de los 100 artículos de la RMF con más consultas en línea, el 24% corresponden a temas relacionados con ACB-M, entre los que destacan: El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017), el modo de acción de *Candida oleophila* para el manejo de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* (Guerrero *et al.*, 2011), y el biocontrol de la “escoba de bruja” con *Trichoderma* spp. bajo condiciones de campo en mango (Michel-Aceves *et al.*, 2013), por mencionar algunos ejemplos.

En este sentido, con la finalidad de potenciar la investigación científica y enriquecer el espectro funcional de bioproductos registrados y comercializados en México, es determinante la incorporación de herramientas de vanguardia y robustas en estudios científicos sobre ACB-M, especialmente su afiliación taxonómica polifacética, fisiología, modo de acción *in vitro*, invernadero y campo, e interacciones con los factores bióticos y abióticos. Lo anterior conduciría al desarrollo de sistemas de producción, formulación, escalamiento e

correspond to subjects related to BCA-M, of which the following stand out: the *Bacillus* genus as a biological control agent and its implications in agricultural biosafety (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017), the action mode of *Candida oleophila* for managing *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* (Guerrero *et al.*, 2011), and “witch broom” biocontrol with *Trichoderma* spp. in mango crops under field conditions (Michel-Aceves *et al.*, 2013), just to name a few examples.

In this regard, to strengthen the scientific research and enrich the functional range of bioproducts registered and sold in Mexico, it is essential to incorporate new cutting-edge and robust tools into scientific studies of BCA-M, especially about their polyphasic taxonomic affiliation, action mode *in vitro*, and under greenhouse and field conditions, as well as their interaction with biotic and abiotic factors. This would lead to the establishment of cost-effective production, formulation, scaling and innovation systems (Galindo *et al.*, 2013; Serrano-Carreón *et al.*, 2010), which, in turn, would help governmental agencies and professionals involved in agricultural production make an efficient, safe, and rigorous technology transfer of these bioproducts to farmers.

**Taxonomic affiliation of BCA-M.** The molecular taxonomic study of BCA-M has been conventionally undertaken using the 16S rRNA gen for prokaryote taxonomic affiliation, because i) it is present in that group of organisms and often exists as a multigenic family; ii) its function has not changed over time, thereby suggesting that slow changes occur in its sequence during the evolutionary course; and iii) its length (1500 bp) is great enough for technical and bioinformatic purposes but it is difficult to identify bacterial species because of its limited genetic diversity (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020). Likewise, the ITS



Cuadro 2. Investigaciones publicadas en la Revista Mexicana de Fitopatología (<https://www.rmfm.smf.org.mx/>) enfocadas al control biológico. Periodo: 2012 al 2020.Table 2. Scientific articles focused on biological control that have been published in the Mexican Journal of Phytopathology (<https://www.rmfm.smf.org.mx/>) Period: 2012 al 2020.

Agente de control biológico	Análisis empleado para identificación	Cultivo	Agente fitopatógeno	Condiciones de evaluación	Mecanismo de acción propuesto	Herramienta empleada para detección de mecanismo de acción	Referencias
<i>Bacillus</i> y <i>Burkholderia</i>	Secuenciación del gen 16S ARNr	-	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>In vitro</i>	Se propone la excreción de metabolitos secundarios	Confrontación dual, estimación cualitativa con escala de 4 niveles de antagonismo y cuantitativo mediante análisis de imagen	Macedo-Castillo <i>et al.</i> , 2012
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Claves taxonómicas	<i>Solanum tuberosum</i>	Nematodos de vida libre	<i>In vitro</i>	Parasitismo	Potencial parasítico	Carrión y Desgarenes, 2012
<i>Pochonia hlamydosporea</i>	Claves taxonómicas	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Nacobbus aberrans</i>	<i>In vitro</i> e invernadero	Parasitismo	Potencial parasitismo, colonización de raíces y prueba de efectividad	Franco-Navarro <i>et al.</i> , 2013
<i>Trichoderma</i>	Claves taxonómicas	<i>Mangifera indica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> y <i>F. subglutinans</i>	Campo	Parasitismo	Severidad de la enfermedad	Michel-Aceves <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Trichoderma</i> y <i>Penicillium</i>	Claves taxonómicas, medios selectivos y pruebas bioquímicas	-	<i>Rhizoctonia solani</i> y <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersi</i>	<i>In vitro</i>	Antibiosis, parasitismo	Confrontación en placa y suelo estéril	Rodríguez-Millán <i>et al.</i> , 2013
<i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i>	Claves taxonómicas	<i>Agave tequilana</i> weber var. Azul	<i>Fusarium</i>	Vivero	Parasitismo, resistencia sistémica, competencia, producción de enzimas líticas	Potencial parasitismo, colonización de raíces y supresión del agente causal de la enfermedad	Tlapal-Bolaños <i>et al.</i> , 2014
<i>B. subtilis</i> y <i>T. harzianum</i>	Uso de microorganismos de productos comerciales	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Phytophthora capsici</i>	Invernadero	Supresión de la enfermedad	Antagonismo, colonización y supresión del agente causal de la enfermedad	Lozano-Alejo <i>et al.</i> , 2015
<i>C. musae</i> , <i>C. loeosporioides</i> e <i>Idriella lunata</i>	Claves taxonómicas	-	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. epidermis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Antibiosis de metabolitos secundarios	Evaluación mediante sensibilidad con los extractos fúngicos (halos de inhibición)	Lagunes-Castro <i>et al.</i> , 2015
Actinomicetos	Claves taxonómicas	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Pectobacterium carotovorum</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Fusarium</i> y <i>R. solani</i>	<i>In vitro</i>	Antibiosis, enzimas líticas,	Evaluación de extractos de actinomicetos mediante difusión en agar, halos de inhibición, confrontación dual, concentración mínima inhibitoria	Pérez-Rojas <i>et al.</i> , 2015
<i>T. viride</i> y <i>B. subtilis</i>	Uso de microorganismos de productos comerciales	-	<i>Sclerotinia minor</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , y <i>S. cepivorum</i>	<i>In vitro</i>	Competencia, micoparasitismo y antibiosis	Confrontación dual	Pérez-Moreno <i>et al.</i> , 2015

Cuadro 2. Continúa

**Cuadro 2. Continuación.**

**Table 2. Continuation.**

Agente de control biológico	Análisis empleado para identificación	Cultivo	Agente fitopatígeno	Condiciones de evaluación	Mecanismo de acción propuesto	Herramienta empleada para detección de mecanismo de acción	Referencias
<i>Bacillus</i> y <i>Trichoderma</i>	Claves taxonómicas y secuenciación del gen 18S ARNr y 16S ARNr	-	<i>F. oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> y <i>Alternaria alternata</i>	<i>In vitro</i>	Parasitismo, antibiosis, producción de enzimas líticas	Confrontación dual	Rios-Velasco <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus</i> spp.	Claves taxonómicas	<i>Capsicum chinense</i>	<i>F. equiseti</i> y <i>F. solani</i>	<i>In vitro</i> e invernadero	Competencia, producción de metabolitos y enzimas líticas, promoción del crecimiento vegetal, inducción de resistencia sistémica	Confrontación dual, inducción de resistencia, severidad de la enfermedad	Mejía-Bautista <i>et al.</i> , 2016
<i>Trichoderma</i>	Claves taxonómicas y secuenciación del gen ITS1, ITS4 y tef1a	-	<i>P. infestans</i>	<i>In vitro</i>	Parasitismo	Confrontación dual	García-Núñez <i>et al.</i> , 2017
Hongos micorrízicos arbusculares	Uso de microorganismos de productos comerciales	<i>Agave cupreata</i>	<i>F. oxysporum</i>	Invernadero	Competencia por sitio de colonización, cambios en la composición de exudados radiculares, inducción de resistencia, promoción del crecimiento vegetal	Colonización de raíces y severidad de la enfermedad	Trinidad-Cruz <i>et al.</i> , 2017
<i>Saccharicola</i>	Microorganismos provenientes de trabajos previos	<i>Capsicum annuum</i>	<i>P. capsici</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>R. solani</i>	<i>In vitro</i> e invernadero	Parasitismo, competencia, producción de enzimas, antibiosis	Confrontación dual, prueba de parasitismo de Riddell, microscopía de barrido, incidencia y severidad de la enfermedad	Uc-Arguelles <i>et al.</i> , 2017
<i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i>	Microorganismos provenientes de trabajos previos	<i>M. domestica</i>	<i>P. cactorum</i>	Invernadero	Promoción del crecimiento vegetal, producción de fitohormonas, inducción de resistencia	Confrontación, severidad de la enfermedad	Ruiz-Cisneros <i>et al.</i> , 2017
<i>Lecanicillium</i> , <i>alcarisporium</i> , <i>Sporothrix</i> y <i>Simplicillium</i>	Claves taxonómicas	-	<i>Hemileia vastatrix</i>	<i>In vitro</i>	Micoparasitismo	Confrontación dual, parasitismo	Gómez-De la Cruz <i>et al.</i> , 2017
<i>B. amyloliquifaciens</i> y <i>B. thuringiensis</i>	Claves taxonómicas y secuenciación del gen 16S ARNr	-	<i>P. capsici</i>	<i>In vitro</i> e invernadero	Antibiosis, producción de lipopéptidos, promoción del crecimiento vegetal	Inhibición germinativa de zoosporas con inóculo bacteriano y filtrados, eficacia de biocontrol	Ley-López <i>et al.</i> , 2018

Cuadro 2. Continúa

**Cuadro 2. Continuación.**  
**Table 2. Continuation.**

Agente de control biológico	Análisis empleado para identificación	Cultivo	Agente fitopatógeno	Condiciones de evaluación	Mecanismo de acción propuesto	Herramienta empleada para detección de mecanismo de acción	Referencias
<i>B. subtilis</i>	AFLP (EcoR y MseI)	-	<i>R. solani</i>	<i>In vitro</i>	Antibiosis, producción de enzimas líticas,	Sobrenadante difusión en placa (metabolitos antagonistas), placas microtituladoras BIOLOG (diversidad metabólica)	Jiménez-Delgadillo <i>et al.</i> , 2018
<i>Trichoderma</i> y <i>Bacillus</i>	Claves taxonómicas y secuenciación del gen 18S ARNr, ITS1 e ITS4). <i>Bacillus</i> proviene de trabajos previos	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>P. infestans</i>	<i>In vitro</i>	Producción de enzimas líticas, metabolitos promotores de crecimiento vegetal, antibiosis, inducción de resistencia, producción de lipopéptidos	Confrontación dual, tipo de antagonismo (escala de Bell)	Ruiz-Cisneros <i>et al.</i> , 2018
<i>P. fluorescens</i>	Claves taxonómicas y secuenciación del gen 16S ARNr	<i>S. lycopersicum</i>	<i>A. alternata</i>	<i>In vitro</i> e invernadero	Producción de compuestos extracelulares inhibidores enzimáticos, antibiosis	Difusión en agar de extractos, germinación de conidios y crecimiento micelial, incidencia y severidad de la enfermedad	Rodríguez-Romero <i>et al.</i> , 2019
<i>Simplicillium</i> y <i>Lecanicillium</i>	Secuenciación del gen 18S ARNr, ITS1 e ITS4	-	<i>Hemileia vastatrix</i>	<i>In vitro</i>	Parasitismo	Confrontación dual, parasitismo	García-Nevárez e Hidalgo-Jamison, 2019
<i>T. harzianum</i>	No se menciona	<i>Carya illinoensis</i>	<i>Phymatotrichopsis omnivora</i>	vivero	Antagonismo	Desinfestación reductiva	Samaniego-Gaxiola <i>et al.</i> , 2019
<i>T. harzianum</i> y <i>B. subtilis</i>	Microorganismos provenientes de trabajos previos	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Sclerotinia minor</i> y <i>Thecaphora frezzi</i>	<i>In vitro</i> y campo	Producción de enzimas líticas, promoción del crecimiento vegetal	Inoculación de sustrato estéril, incidencia de enfermedad, crecimiento de plantas, peso seco.	Illa <i>et al.</i> , 2020
<i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>B. subtilis</i>	Claves taxonómicas, pruebas bioquímicas, y metabolismo (tarjeta VITEX 2)	-	<i>S. cepivorum</i>	<i>In vitro</i>	Producción de metabolitos, sideróforos, enzimas líticas, promoción del crecimiento vegetal, tolerancia a estrés, antibiosis	Confrontación dual, actividad del ACC desaminasa, tolerancia a NaCl y prueba colorimétrica para producción de sideróforos y AIA	Ocegueda-Reyes <i>et al.</i> , 2020

innovación costo-efectivos (Galindo *et al.*, 2013; Serrano-Carreón *et al.*, 2010). Esto permitiría a dependencias gubernamentales y profesionistas involucrados en la producción agrícola una transferencia tecnológica eficiente, segura y rigurosa de estos bioproductos a los agricultores.

**Afiliación taxonómica de ACB-M.** El estudio taxonómico molecular de ACB-M se ha realizado convencionalmente con el gen 16S ARNr para la afiliación taxonómica de procariontes debido a que: i) está presente en dicho grupo de organismos y a menudo existe como una familia multigénica; ii) su función a lo largo del tiempo no ha cambiado, sugiriendo que su secuencia cambia lentamente en el curso evolutivo, y iii) su longitud (1500 pb) es lo suficientemente grande para propósitos técnicos y bioinformáticos, aunque limita la identificación de especies bacterianas debido a su restringida diversidad genética (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020). De forma similar, en los eucariotas, la región ITS (internal transcribed spacer, por sus siglas en inglés), conformada por ITS1, el gen 5.8S ARNr e ITS2, es muy conservada a nivel de género, cuya longitud (650-1,100 pb) y limitada diversidad genética entre especies dificulta su uso para la diferenciación y afiliación taxonómica correcta. Además, la afiliación taxonómica de los ACB-M también se basa en el empleo de técnicas moleculares (RAPDs, ISSR, RFLP, AFLP) y/o técnicas de PCR de detección rápida mediante el uso de genes marcadores, tales como: 16S ARNr, 28S ARNr, ITS,  $\beta$ -tubulina, RPB2, factor de elongación y SCAR (Mazrou *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2019). La resolución taxonómica a nivel de especie o subespecie (*i.e.* haplotipos) dependerá de la técnica molecular seleccionada, enzimas de restricción y genes o regiones seleccionadas.

La afiliación taxonómica correcta es determinante para la bioprospección de ACB-M bioseguros,

region (internal transcribed spacer) in eukaryotes, which is made up of the ITS1, 5.8S rRNA gene and ITS2, is highly conserved at the genus level, whose length (650-1,100 bp) and limited genetic diversity among species hampers their correct differentiation and taxonomic affiliation. The BCA-M taxonomic affiliation is based on the use of molecular techniques (RAPDs, ISSR, RFLP, AFLP) and/or PCR for rapid detection using marker genes, such as 16S rRNA, 28S rRNA, ITS,  $\beta$ -tubulin, RPB2, elongation factor, SCAR (Mazrou *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2019). The taxonomic resolution at the species or subspecies level (*i.e.*, haplotypes) will depend on the preferred molecular technique, restriction enzymes, and selected genes or regions.

The correct taxonomic affiliation is decisive for bioprospecting biosafe BCA-M, considering that several genera have species with antagonistic activity against phytopathogens but may also have other species that cause diseases in plants, animals and/or humans. For example, *Bacillus* is one of the bacterial genera that has been most reported and studied worldwide because of its biological control capacity. The *B. cereus* group has been extensively studied and is made up of, at least, eight species that are closely related: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* and *B. toyonensis*. However, the members of this group have a significant impact on human health, agriculture, and the food industry, *i.e.*, *B. anthracis* is the etiological agent of anthrax, an obligate pathogen that poses a threat to human and herbivores health, while *B. thuringiensis* is a biological management agent which is extensively used and recognized as a safe biopesticide in the world (Liu *et al.*, 2015). On the other hand, *B. cereus* is an opportunistic pathogen that often causes food poisoning and has recently been reported as an emerging phytopathogen. At the

ya que diversos géneros tienen especies con actividad antagónica contra fitopatógenos, pero pueden poseer otras especies causantes de enfermedades en plantas, animales y/o humanos. Por ejemplo, *Bacillus* es uno de los géneros bacterianos más reportados y estudiados a nivel mundial por su capacidad de control biológico. El grupo de *B. cereus* ha sido ampliamente estudiado y comprende, al menos, ocho especies estrechamente relacionadas: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* y *B. toyonensis*. Sin embargo, los miembros de este grupo tienen un impacto significativo en la salud humana, la agricultura y la industria alimentaria; *i.e.* *B. anthracis* es el agente etiológico del ántrax, un patógeno obligado que representa una amenaza para la salud humana y de los herbívoros, mientras que *B. thuringiensis* es un agente de manejo biológico ampliamente utilizado y reconocido como un bioplaguicida seguro a nivel mundial (Liu *et al.*, 2015). Por otro lado, *B. cereus* es un patógeno oportunista que a menudo causa intoxicación alimentaria y ha sido recientemente reportado como un fitopatógeno emergente. A nivel intraespecífico, miembros del grupo de *B. cereus* poseen secuencias del gen 16S ARNr muy similares y genomas altamente conservados (Ehling-Schulz *et al.*, 2019), lo que dificulta su correcta afiliación taxonómica. Otro grupo que evidencia la importancia taxonómica con un enfoque molecular debido a restricciones de caracterización bioquímica, biológica y morfológica es el género *Burkholderia* (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020; Serret-López *et al.*, 2021; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018).

En los últimos años, la introducción de diversas estrategias y plataformas de secuenciación de siguiente generación (NGS, por sus siglas en inglés), herramientas genómicas, filogenómicas y bioinformáticas ha contribuido significativamente a una mejor comprensión de la evolución e interacción

intraspecific level, members of the *B. cereus* group have sequences of the 16S rRNA gene that are very similar and highly conserved genomes (Ehling-Schulz *et al.*, 2019), a fact that makes their correct taxonomic affiliation difficult. Another group of taxonomic importance with a molecular approach is the *Burkholderia* genus, due to biochemical, biological, and morphological characterization restrictions (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020; Serret-López *et al.*, 2021; de los Santos-Villalobos *et al.*, 2018). In recent years, the introduction of various next-generation sequencing strategies and platforms (NGS), as well as genomic, phylogenomic, and bioinformatic tools, have significantly contributed to a better understanding of the microorganism's evolution and interaction with their environment (Jagadeesan *et al.*, 2019). These tools have also made it possible to study microbial strains at the genomic level, which has strengthened their correct taxonomic affiliation and identification of the genes involved in colonization and adaptation to the host, and their mechanisms of action, among other aspects (Figure 1).

**Genomic studies for the taxonomic affiliation of BCA of microbial origin (BCA-M).** At present, the robust taxonomic affiliation of microorganisms is based on the extraction, sequencing, and analysis of their genome, partial or total, supported by morphological, physiological, and metabolic traits (Figure 2). For this, sequencing high-quality DNA of the microorganism of interest and validating the obtained data through a quality control process are decisive factors, because reads of DNA without the required quality can be excluded in subsequent analysis (Xi *et al.*, 2019). FastQC is a digital tool designed to perform numerous quality control checks of the sequences that are obtained (Andrews, 2010). Then, the adapters must be trimmed, and low-quality data of the obtained



entre microorganismos y su ambiente (Jagadeesan *et al.*, 2019). Además, estas herramientas han permitido el estudio de cepas microbianas a nivel genómico, lo que ha robustecido su correcta afiliación taxonómica y la identificación de genes involucrados en la colonización y adaptación al hospedero, sus mecanismos de acción, entre otros aspectos (Figura 1).

### **Estudios genómicos para la afiliación taxonómica de ACB de origen microbiano (ACB-M).**

En la actualidad, la afiliación taxonómica robusta de microorganismos se basa en la extracción, secuenciación y análisis de su genoma, parcial o total, apoyado de rasgos morfológicos, fisiológicos y metabólicos (Figura 2). Para esto, es determinante la secuenciación del ADN de alta calidad del microorganismo de interés y validar los datos obtenidos por un proceso de control de calidad, lo cual permite la exclusión de lecturas de ADN sin la calidad necesaria para análisis posteriores (Xi *et al.*, 2019). FastQC es una herramienta digital que permite realizar numerosas comprobaciones de control de calidad de las secuencias obtenidas (Andrews, 2010). Posteriormente, se debe eliminar los adaptadores y remover datos de baja calidad de la información genómica obtenida, mediante el uso de los programas como Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) y Cutadapt v1.18 (Martin, 2011). Posteriormente, el genoma es ensamblado, con programas como SPAdes v3.14.1, el cual ensambla los péptidos no ribosomales asociados a mecanismos de control biológico (Bankevich *et al.*, 2012), hybrid SPAdes (Antipov *et al.*, 2016), Velvet v1.2.10 (Zerbino, 2008), IDBA-UD v1.1.1 (Peng *et al.*, 2012), Canu (Koren *et al.*, 2017) y SOAPdenovo2 (Luo *et al.*, 2012). Una vez que el genoma ha sido ensamblado, se deben reordenar los *contigs* obtenidos basados en un genoma de referencia, mediante el programa Mauve contig Mover 2.4.0 (Darling *et al.*, 2004).

genomic information removed using programs such as Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) and Cutadapt v1.18 (Martin, 2011). The genome is assembled using programs such as SPAdes v3.14.1, which assembles non-ribosomal peptides associated with biological control mechanisms (Bankevich *et al.*, 2012), hybrid SPAdes (Antipov *et al.*, 2016), Velvet v1.2.10 (Zerbino, 2008), IDBA-UD v1.1.1 (Peng *et al.*, 2012), Canu (Koren *et al.*, 2017) and SOAPdenovo2 (Luo *et al.*, 2012). Once the genome has been assembled, the obtained *contigs* are rearranged based on a reference genome with the Mauve contig Mover 2.4.0 program (Darling *et al.*, 2004). Finally, the genome annotation is carried out to identify the encoding sequences and associate them with a function or identify hypothetical proteins. For this, the National Center for Biotechnology Information (NCBI) provides an automatic prokaryotic genome annotation tool. Similarly, RAST and xBASE2 are web servers used to annotate genomes of bacteria and archaea (Aziz *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2008). Genome contamination can be quantified using different software packages, such as checkM and Quast, for prokaryotes and eukaryotes (Gurevich *et al.*, 2013; Parks *et al.*, 2015). Recently, bioinformatics tools *in silico* have been developed for taxonomic affiliation of bacterial species (Figure 2), of which the most important is the overall genome relatedness indices (OGRI), such as the average nucleotide identity (ANI) and the genome-to-genome distance calculator (GGDC), to replace the DNA–DNA hybridization standard (DDH) (Richter *et al.*, 2016). This has been used to study prokaryotes only since there is no equivalent OGRI for fungal strains (Raja *et al.*, 2017).

ANI is widely used to establish similarity between two prokaryote species at the genomic level (Yoon *et al.*, 2017) and is defined as the average percent of nucleotide sequences identity

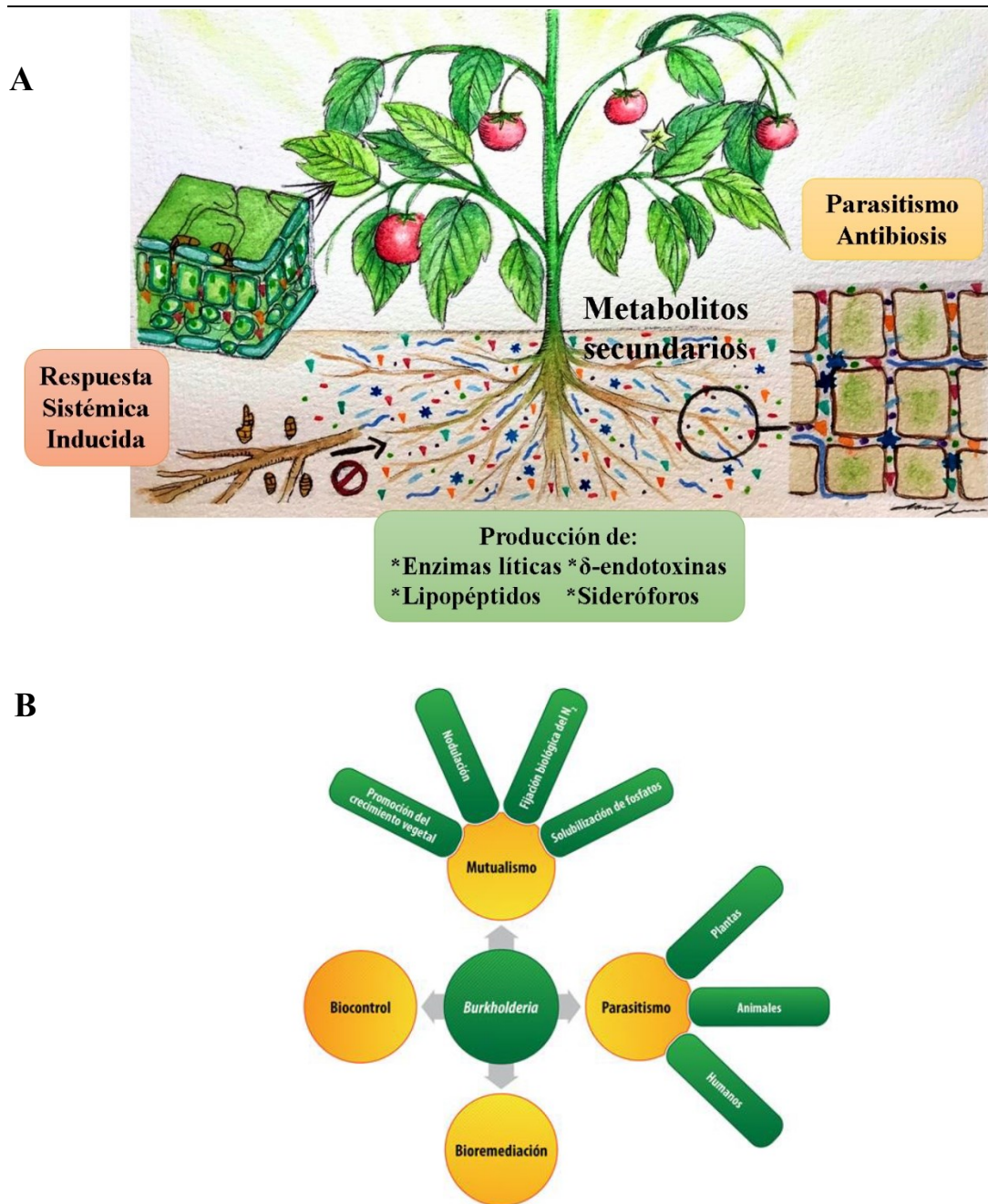


Figura 1. A. Mecanismos de acción más estudiados y reportados en agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) (Fuente: Autores). B. Multiplicidad de funciones bióticas-abióticas que pueden estar asociados con un ACB-M. Caso *Burkholderia* (Fuente: Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

Figure 1. A. Mechanisms of action that have been most studied and reported in biological control agents of microbial origin (BCA-M) (Source: Authors). B. Multiple biotic-abiotic functions that can be associated with an BCA-M, *Burkholderia* case (Source: Espinosa-Victoria *et al.*, 2020).

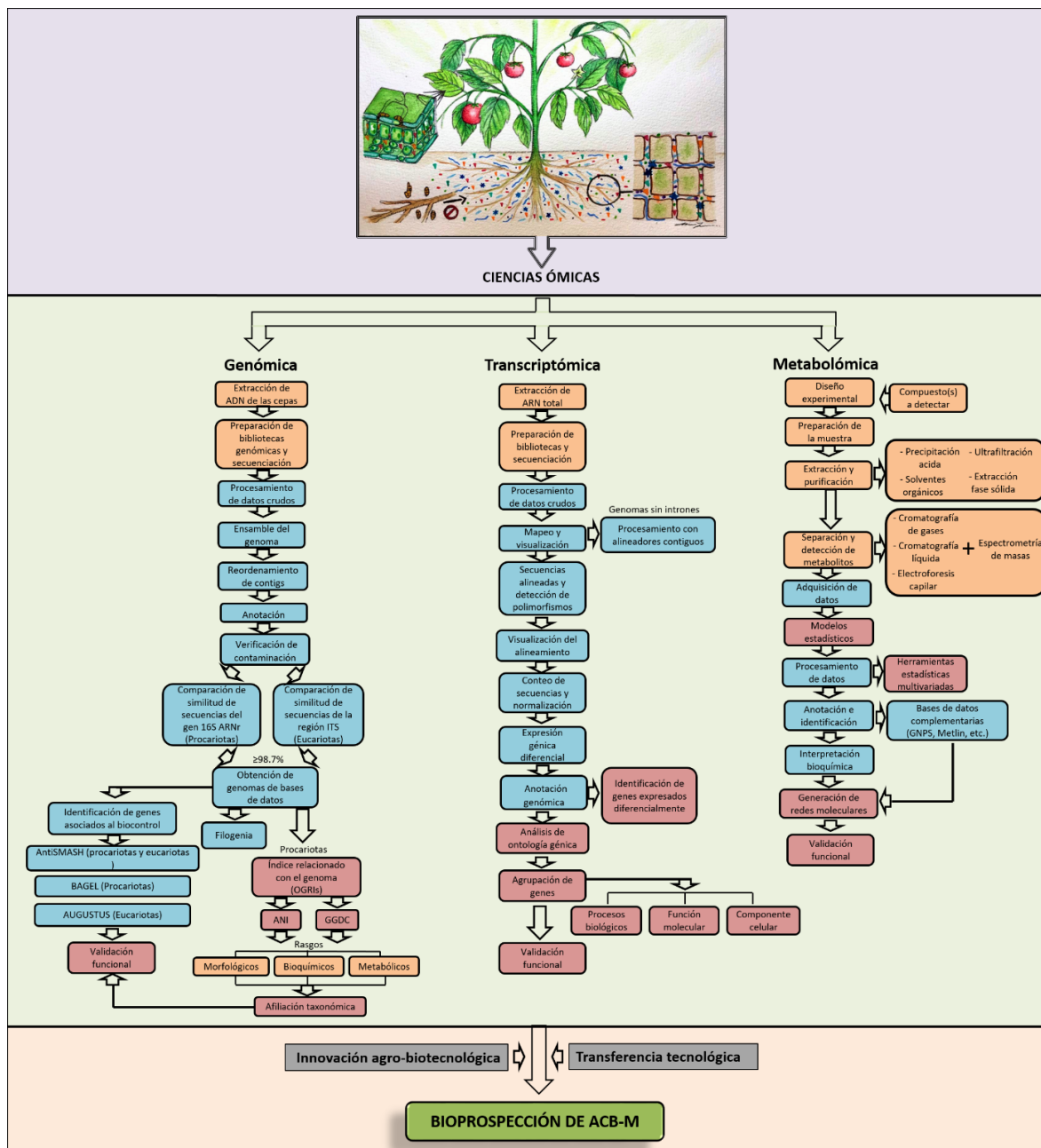


Figura 2. Flujo de procesos metodológicos genómicos y metabólicos empleados en investigación taxonómica y para establecer mecanismos de acción de agentes de control biológico de origen microbiano (ACB-M) aplicados en la supresión de fitopatógenos.

Figure 2. Workflow of the genomic and metabolic methodological processes used in taxonomic research and to establish the mechanisms of action of biological control agents of microbial origin (BCA-M) to suppress phytopathogens.

Finalmente, la anotación del genoma se lleva a cabo para identificar las secuencias codificantes y asociarles una función, o identificar proteínas hipotéticas; para esto el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) proporciona una herramienta de anotación de genoma procariótico automático. Similarmente, RAST y xBASE2 son servidores web empleados para anotar genomas de bacterias y arqueas (Aziz *et al.*, 2008; Chaudhuri *et al.*, 2008). Por último, la contaminación del genoma se puede cuantificar con diversos softwares como checkM y Quast, para procariotas y eucariotas (Gurevich *et al.*, 2013; Parks *et al.*, 2015).

Recientemente, se han desarrollado herramientas bioinformáticas *in silico* para la afiliación taxonómica de especies bacterianas (Figura 2), entre las cuales destacan los índices generales de relación del genoma (OGRI, por sus siglas en inglés), tales como: la identidad de nucleótidos promedio (ANI, por sus siglas en inglés) y la Calculadora de distancia de genoma a genoma (GGDC, por sus siglas en inglés), para reemplazar el estándar de hibridación ADN-ADN (DDH, por sus siglas en inglés) (Richter *et al.*, 2016). Lo anterior sólo se ha utilizado para el estudio en procariotas, ya que para cepas fúngicas no existen equivalentes de OGRI (Raja *et al.*, 2017).

De esta manera, ANI es ampliamente utilizada para establecer la similitud -a nivel genómico- entre dos especies procariotas (Yoon *et al.*, 2017), y es definida como el porcentaje promedio de identidad de secuencias de nucleótidos de genes ortólogos compartidos entre dos genomas (Sentausa y Fournier, 2013). El valor ANI del genoma en estudio corresponde al promedio de los valores de identidad entre todos los pares de fragmentos ortólogos entre dos genomas. El valor de ANI empleado para afiliar una cepa a una especie bacteriana previamente descrita es  $\geq 95-96\%$  (Varghese *et al.*, 2015; Moriuchi *et al.*, 2019).

of orthologous genes shared between two genomes (Sentausa and Fournier, 2013). The ANI value of the genome under study corresponds to the average of the identity values among all the pairs of orthologous fragments between two genomes. The ANI value used to affiliate a strain to a bacterial species previously described is  $\geq 95-96\%$  (Varghese *et al.*, 2015; Moriuchi *et al.*, 2019).

On the other hand, unlike ANI (index similarity type), GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/>) is an OGRI based on the distance ratio which enables the alignment of the genome of interest with one of reference; then a set of high-scoring segment pairs (HSP) is obtained, known as “intergenomic coincidences”, from which specific distance formulae are calculated to transform the HSP data to a GGDC value (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013), using a  $>70\%$  GGDC value to taxonomically affiliate a strain to a bacterial species previously reported.

Currently, the use of tools and strategies focused on robust and comprehensive BCA-M taxonomic affiliation (based on genome sequencing and polyphasic studies) is experiencing a boom in Mexico. For example, one of these studies was recently published by de los Santos-Villalobos *et al.* (2019), who reported a new bacterial species with biological control capacity against *Bipolaris sorokiniana*, an emerging agent that causes spot blotch in wheat in the Yaqui Valley, Mexico. Initially, this bacterial strain (TE3<sup>T</sup>) was affiliated to the *Bacillus* genus based on the partial sequencing of the 16S rRNA gene (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2018). Then, Villa-Rodriguez *et al.* (2019) proposed its taxonomic affiliation to the *B. subtilis* species by sequencing the whole 16S rRNA gene. Finally, the sequencing and study of the whole genome, the OGRI analysis (ANI and GGDC), and the polyphasic characterization of strain TE3<sup>T</sup> allowed a robust taxonomic affiliation of this BCA to a new bacterial species, termed *B. cabrialesii* (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019). *Bacillus cabrialesii*



Por otra parte, a diferencia de ANI (índice de tipo similitud), GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/>) es un OGRÍ basado en la relación de distancia, que permite que se alinee el genoma de interés contra uno de referencia; posteriormente, se obtiene un conjunto de pares de segmentos de alta puntuación (HSP), titulados “coincidencias intergenómicas”, a partir de los cuales se calculan fórmulas de distancia específica para transformar los datos de HSP en el valor de GGDC (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013), utilizando un valor de GGDC >70% para afiliar taxonómicamente una cepa a una especie bacteriana previamente reportada.

En la actualidad, el uso de estas herramientas y estrategias enfocadas a una afiliación taxonómica robusta e integral de ACB-M (basadas en la secuenciación de genomas y estudios polifacéticos) se encuentra en auge en México. Por ejemplo, uno de estos trabajos fue recientemente publicado por de los Santos-Villalobos *et al.* (2019), quienes reportaron una nueva especie bacteriana con capacidad de control biológico contra *Bipolaris sorokiniana*, agente emergente causante de la mancha borrosa en el trigo, en el Valle del Yaqui, México. Inicialmente, esta cepa bacteriana (TE3<sup>T</sup>) fue afiliada al género *Bacillus*, con base a la secuenciación parcial del gen 16S ARNr (Valenzuela-Aragón *et al.*, 2018). Posteriormente, Villa-Rodríguez *et al.* (2019) propusieron su afiliación taxonómica a la especie *B. subtilis*, mediante la secuenciación completa del gen 16S ARNr. Finalmente, la secuenciación y estudio completo del genoma, el análisis de OGRÍs (ANI y GGDC), y la caracterización polifacética de la cepa TE3<sup>T</sup> permitieron una afiliación taxonómica robusta de este ACB a una nueva especie, nombrada *B. cabrialesii* (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2019). La inoculación de *B. cabrialesii* TE3<sup>T</sup> en plantas de trigo infectadas por *B. sorokiniana* resultó en la mitigación de la enfermedad reduciendo la escala de severidad de infección en hoja de 3-5

TE3<sup>T</sup> inoculation in wheat plants infected by *B. sorokiniana* mitigated the disease by reducing the 3-5 severity scale of leaf infection and the density of lesions to  $3.06 \pm 0.6$  cm<sup>-2</sup> leaves compared to plants inoculated with the phytopathogen (8-9 and  $6.46 \pm 1.46$  lesions cm<sup>-2</sup>).

**Study of the action mechanisms in BCA-M.** In recent decades, studies of the effect of BCA-M in phytopathogens management have been carried out. This has been useful to elucidate the different mechanisms used by these agents to reduce the growth, development, and infection of phytopathogens in cultivated plants. Among the interaction mechanisms with suppressive effects that have been most studied and reported are i) mycoparasitism; ii) antibiosis; iii) lytic enzymes activity; iv) siderophore biosynthesis; v) production of  $\delta$ -endotoxins; vi) lipopeptides biosynthesis; and vii) induced systemic response (Figure 1A). However, since the action of the BCA-M involves non-parasitic phases that are essential for their adaptation to the edaphic or endophytic environment and ensure their suppressive activity, they must be systematically studied to design soil, substrate, or plant bioremediation strategies (Figure 1B).

In Mexico, based on the contributions published by the Mexican Journal of Phytopathology and other national and international scientific journals, there are many scientific studies focused on the selection and evaluation *in vitro* of promising BCA-M. Although to a lesser extent, the specific mechanisms of action previously mentioned have been also explored (Table 2 and Figure 1). However, the innovation of biopesticides developed in Mexico and other countries requires that new BCA along with the mechanisms responsible for the activity observed be identified, both in new strains and in those that have been already reported, because the



y la densidad de lesiones a  $3.06 \pm 0.6 \text{ cm}^{-2}$  hoja, en comparación con plantas inoculadas con el fitopatógeno (8 - 9 y  $6.46 \pm 1.46$  lesiones  $\text{cm}^{-2}$ ).

**Estudio de los mecanismos de acción de ACB-M.** Durante las últimas décadas se ha estudiado el efecto de ACB-M en el manejo de fitopatógenos. Lo anterior, ha permitido dilucidar los diferentes mecanismos empleados por dichos agentes para reducir el crecimiento, desarrollo e infección de fitopatógenos en plantas cultivadas. Entre los mecanismos de interacción con efectos supresivos más estudiados y reportados destacan i) micoparasitismo, ii) antibiosis, iii) actividad de enzimas líticas, iv) biosíntesis de sideróforos, v) producción de  $\delta$ -endotoxinas, vi) biosíntesis de lipopéptidos, y vii) respuesta sistémica inducida (Figura 1A). Sin embargo, la acción de los ACB-M implican fases no parasíticas determinantes en su adaptación al medio edáfico o endofítico para garantizar su actividad supresiva, por lo que deben estudiarse de manera sistémica para diseñar estrategias de bioremediación de suelos, sustratos u órganos vegetales (Figura 1B).

En México, con base en las contribuciones publicadas en la Revista Mexicana de Fitopatología y revistas nacionales e internacionales en el área, existe un gran número de trabajos científicos desarrollados para la selección y evaluación *in vitro* de ACB-M promisorios. Aunque en menor proporción, también se han explorado mecanismos de acción específicos descritos anteriormente (Cuadro 2 y Figura 1). Sin embargo, la innovación de bio-plaguicidas desarrollados en México y otros países demanda la identificación de nuevos ACB y los mecanismos responsables de la actividad observada, tanto en nuevas cepas como en aquellas ya reportadas, debido a que no necesariamente los mecanismos o metabolitos que emplean dichos ACB *in vitro* son los responsables del efecto observado

mechanisms or metabolites used by those BCA are not necessarily responsible for the observed effect or are directly related to their bioactivity in the field. Consequently, state-of-the-art and integrating strategies that allow a better understanding of the mechanisms of action of the BCA-M under field conditions must be implemented. This would increase the probabilities of success in implementing these agents in the agricultural sector, thereby optimizing the production processes, scaling new bioproducts, and promoting the innovation of those already registered and available on the market.

**Genomic studies of BCA-M to identify potential mechanisms of action.** So far, several strategies and platforms have been developed to identify *clusters* of genes in genomes associated with biological control, especially those related to non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) and polyketide synthases (PKS) (Figure 2). These secondary metabolites exhibit a significant variety of biological activities, and many of them are clinically valuable antimicrobial, antifungal, antiparasitic, antitumor, and immunosuppressant compounds (Ansari *et al.*, 2004). Among the tools to identify those *clusters* of genes in the genome of BCA of bacterial origin are PRISM (Skinnider *et al.*, 2017), CLUSEAN (Weber *et al.*, 2009), RIPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017), and for fungal genomes, SNAP (Jhonson *et al.*, 2008), Augustus (Keller *et al.*, 2011) and GeneMark-ES (Borodovsky and Lomsadze, 2011). However, the AntiSMASH 5.0 and BAGEL4 tools have been widely reported and used for these purposes, but the identification of genes associated with the BCA-M activity using these tools is predictive, and, for this reason, their expression and function *in vivo* must be further studied and complemented with other strategies that will be later described.

o están relacionados de forma directa con su bioactividad en campo. En consecuencia, es determinante el empleo de estrategias de vanguardia e integradoras que permitan un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los ACB-M bajo condiciones de campo. Lo anterior incrementaría las probabilidades de éxito de estos agentes en su implementación agrícola y permitiría la optimización de procesos de producción y escalamiento de nuevos bioproductos, y la innovación de bioproductos ya registrados y disponibles en el mercado.

**Estudios genómicos de ACB-M para la identificación de potenciales mecanismos de acción.** En la actualidad, se han desarrollado diversas estrategias y plataformas enfocadas a la identificación de *clusters* de genes en el genoma asociados al control biológico, principalmente aquellos relacionados a las sintetetas de péptido no ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés) y las policétido sintetas (PKS, por sus siglas en inglés) (Figura 2). Estos metabolitos secundarios exhiben una significativa diversidad de actividades biológicas, y muchos de ellos son compuestos antimicrobianos, antifúngicos, antiparasitarios, antitumorales e inmunosupresores clínicamente valiosos (Ansari *et al.*, 2004). Entre las herramientas empleadas para la identificación de dichos *clusters* de genes en el genoma de ACB de origen bacteriano se encuentran PRISM (Skinnider *et al.*, 2017), CLUSEAN (Weber *et al.*, 2009), RIPPMiner (Agrawal *et al.*, 2017), mientras que para genomas fúngicos destacan SNAP (Johnson *et al.*, 2008), Augustus (Keller *et al.*, 2011) y GeneMark-ES (Borodovsky y Lomsadze, 2011). Sin embargo, las herramientas AntiSMASH 5.0 y BAGEL4 han sido ampliamente reportadas y utilizadas para estos fines; no obstante, la identificación de genes asociados a la actividad de los ACB-M mediante estas herramientas es predictiva, por lo que, su expresión y función *in vivo* debe ser

AntiSMASH 5.0 uses the HMMer3 tool (<http://hmmer.janelia.org/>) and the translations of the amino acid sequence of all the encoding genes, which are analyzed with profile hidden Markov models (pHMM) based on alignments of multiple sequences associated with experimentally characterized proteins or proteins/domains (Blin *et al.*, 2019). The detection stages use a filtering logic of negative and positive pHMM and their cut-off points, based on the knowledge of the minimum basic components of each type of *clusters* of the genes reported in the scientific literature.

On the other hand, BAGEL4 translates into six proteins [one for each open reading framework (ORF)], each of the encoding genes of the BCA genome that is being studied (Van Heel *et al.*, 2018). These proteins are examined to detect the occurrence of certain protein motifs (elements conserved in an amino acid sequence that is usually associated with a specific function) and compared to a peptide database. Finally, the areas of interest (AOI) are identified and thoroughly analyzed. The ORF in AOI are first analyzed using Glimmer3 (Delcher *et al.*, 2007). This program is set up in such a way that Glimmer3 creates a model for each defined AOI. Later, small ORF are named in the intergenic regions. The default setup for these ORFs is a minimum length of 72 bp (24 amino acid residues) and a superposition of 10 bp is allowed with the ORF of Glimmer3.

Currently, the use of these tools for the integrative approach of the potential mechanisms of action of BCA-M are being exponentially developed in Mexico. An example of this is the research of Valenzuela-Ruiz *et al.* (2019), who used this strategy to identify an BCA-M taxonomically affiliated, by studying its genome and OGRIs, as *Bacillus paralicheniformis* TRQ65. The study of the *clusters* of genes associated with NRPS and PKS of the *B. paralicheniformis* TRQ65 genome

ampliamente estudiada y complementadas con otras estrategias que se describirán posteriormente.

AntiSMASH 5.0 utiliza la herramienta HMMer3 (<http://hmmer.janelia.org/>), y las traducciones de la secuencia de aminoácidos de todos los genes codificantes, mismas que se analizan con modelos de perfil oculto de Markov (pHMM, por sus siglas en inglés), basados en alineamientos de secuencias múltiples asociadas a proteínas o proteínas/dominios experimentalmente caracterizados (Blin *et al.*, 2019). La etapa de detección utiliza una lógica de filtrado de pHMM negativos y positivos, y sus puntos de corte, donde se basa en el conocimiento de los componentes básicos mínimos de cada tipo *clusters* de genes reportados en la literatura científica.

Por otra parte, BAGEL4 traduce en seis proteínas [una para cada marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés)], cada uno de los genes codificantes del genoma del ACB estudiado (Van Heel *et al.*, 2018). Estas proteínas se examinan para detectar la ocurrencia de ciertos motivos proteicos (elementos conservados en una secuencia de aminoácidos que habitualmente se asocian con una función específica), y se compara con la base de datos de péptidos. Finalmente, las áreas de interés (AOI, por sus siglas en inglés) son identificadas y analizadas a detalle. Los ORF en el AOI se analizan de primera instancia usando Glimmer3 (Delcher *et al.*, 2007). El programa está configurado para que Glimmer3 realice un modelo para cada AOI definida. Posteriormente, ORF pequeños se denominan en las regiones intergénicas. La configuración pre-determinada para estos ORF es una longitud mínima de 72 bp (24 residuos de aminoácidos) y se permite una superposición de 10 pb con los ORF de Glimmer3.

Actualmente, el empleo de estas herramientas para el acercamiento integrativo de los potenciales mecanismos de acción de ACB-M se están

made it possible to identify nine genes associated with the lipopeptide biosynthesis: lichenicidin, haloduracin, bacteriocin, enterocin and sonorensin (by BAGEL4), and eight genes associated with the lipopeptide biosynthesis: bacillibactin, butirosin, lichenysin, bacitracin, and haloduracin (by antiSMASH). The functionality of those genes was validated through essays of dual confrontation against *Bipolaris sorokiniana*, where an inhibition area of  $1.6 \pm 0.4$  cm was observed, which confirmed the functionality of the putative genes found in the genome of strain TRQ65, associated with biological control of phytopathogens (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019).

**Transcriptomic studies to identify potential mechanisms of action of BCA-M.** The modulation in the gene expression of an organism, associated with its interaction with biotic and/or abiotic factors, is found by conducting transcriptomic studies, which are focused on the study of the gene expression, co-expression patterns, signaling cascades, and regulated molecular mechanisms during a biological condition and specific time (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020).

The transcriptomic studies are highly dependent on high-quality total RNA extracted under the specific conditions of the study, followed by sample preparation and sequencing (Figure 2). The reads taken are filtered through a quality analysis using FastQC (Andrews, 2010), the adapters and low-quality reads are removed using Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) or Prinseq (Schmieder and Edwards, 2011). Subsequently, the reads are aligned with and mapped to a reference genome (or transcriptome) to identify and quantify the regulation of the genes and find out what their allelic variants are (Rollano-Peñaloza and Mollinedo-Portugal 2017). The organisms whose genomes have no introns are processed with contiguous

desarrollando de forma exponencial en México. Ejemplo de ello, es el trabajo de Valenzuela-Ruiz *et al.* (2019) quienes emplearon esta estrategia para la identificación de un ACB-M afiliado taxonómicamente, a través del estudio de su genoma y OGRIs, como *Bacillus paralicheniformis* TRQ65. El estudio de los *clusters* de genes asociados a NRPS y PKS del genoma de *B. paralicheniformis* TRQ65 permitió identificar nueve genes asociados con la biosíntesis de lipopéptidos: lichenicidina, haloduracina, bacteriocina, enterocina y sonorenina (por BAGEL4), y ocho genes asociados con la biosíntesis de lipopéptidos: bacillibactina, butirocina, liquenicina, bacitracina y haloduracina (antiSMASH). La funcionalidad de dichos genes se validó mediante ensayos de confrontación dual contra *Bipolaris sorokiniana*, observando una zona de inhibición de  $1.6 \pm 0.4$  cm, lo que confirmó la funcionalidad de los genes putativos encontrados en el genoma de la cepa TRQ65, asociados al control biológico de fitopatógenos (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019).

**Estudios transcriptómicos para la identificación de potenciales mecanismos de acción de ACB-M.** La modulación en la expresión génica de un organismo, asociadas a sus interacciones con factores bióticos y/o abióticos, son reveladas por estudios transcriptómicos; los cuales se centran en el estudio de la expresión génica, patrones de co-expresión, cascadas de señalización y mecanismos moleculares regulados durante una condición biológica y tiempo específico (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2020). Los estudios transcriptómicos son altamente dependientes del ARN total de alta calidad extraído bajo las condiciones específicas de estudio, seguido de la preparación y secuenciación de las muestras (Figura 2). Las lecturas obtenidas son filtradas mediante un análisis de calidad por FastQC (Andrews, 2010), se eliminan los adaptadores y lecturas de

aligners, such as Bowtie2 (Langmead and Salzberg 2012) or BWA (Li and Durbin 2009), which are designed to align DNA. Conversely, the best option when there are genomes with introns is the use of aligners such as Tophat2 (Kim *et al.*, 2013), Hisat2 (Kim *et al.*, 2013), STAR (Dobin *et al.*, 2013), GSNAP (Wu and Nacu 2010), SOAP2 (Li *et al.*, 2009) or Kallisto (Bray *et al.*, 2016). The assembly of transcripts and estimation of abundances is usually performed with Cufflinks and Cuffmerge (Trapnell *et al.*, 2009), but there are also reports of transcriptomic studies using DESeq (Love *et al.*, 2014) or HTSeq-count (Anders and Huber, 2015).

The aligned sequences can be arranged with Samtools (Li, 2011) and Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). This information can be used by programs such as Bedtools (Quinlan and Hall, 2010) to detect single-nucleotide polymorphisms (SNP) (Rollano-Peñaloza and Mollinedo-Portugal, 2017). The appropriate analysis of the gene expression is based on a standardization due to the different genome sizes and depth variation in each sample sequencing. Therefore, when studying *de novo* transcriptomes, it is recommended to use RSEM software (Li and Dewey, 2011) because it also provides standardization values. Then, to identify the differentially expressed genes, a genomic annotation must be performed by aligning the sequences of the genes that were identified as significantly expressed (Camacho *et al.*, 2009). Then, the gene families and/or their products are identified using software packages such as HMMER (Potter *et al.*, 2018), InterProScan (Mitchell *et al.*, 2015), and SignalP (Petersen *et al.*, 2011). Finally, a gene ontology analysis (GO) is carried out, whereby genes are grouped by biological processes, molecular function, cell component and metabolic pathway analysis (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2004) and other more complex groups (PANTHER) (Mi *et al.*, 2013), where tools such as AgriGO (Tian *et*

baja calidad por Trimmomatic v0.36 (Bolger *et al.*, 2014) o Prinseq (Schmieder y Edwards, 2011). Posteriormente, se procede con el alineamiento y mapeo de las lecturas con un genoma (o transcriptoma) de referencia para identificar y cuantificar la regulación de los genes, así como conocer sus variantes alélicas (Rollano-Peñalosa y Mollinedo-Portugal 2017). Los organismos cuyos genomas no presentan intrones son procesados con alineadores continuos, como Bowtie2 (Langmead y Salzberg 2012) o BWA (Li y Durbin 2009), diseñados para alinear ADN. Caso contrario, cuando se tienen genomas que poseen intrones es mejor utilizar alineadores como Tophat2 (Kim *et al.*, 2013), Hisat2 (Kim *et al.*, 2013), STAR (Dobin *et al.*, 2013), GSNAP (Wu y Nacu 2010), SOAP2 (Li *et al.*, 2009) o Kallisto (Bray *et al.*, 2016). El ensamble de transcritos y la estimación de sus abundancias es realizado por lo general con Cufflinks y Cuffmerge (Trapnell *et al.*, 2009); aunque también se han reportado estudios transcriptómicos utilizando DESeq (Love *et al.*, 2014) o HTSeq-count (Anders y Huber, 2015).

Las secuencias alineadas pueden ser ordenadas con el uso de Samtools (Li, 2011) y Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Esta información puede ser utilizada por programas como Bedtools (Quinlan y Hall, 2010) para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) (Rollano-Peñalosa y Mollinedo-Portugal, 2017). El análisis apropiado de expresión génica se basa en una normalización debido a los diversos tamaños de los genes y a la variación de la profundidad en la secuenciación de cada muestra. De esta manera, en el estudio de transcriptomas *de novo* es recomendado el software RSEM (Li y Dewey, 2011), que también proporciona valores de normalización. Posteriormente, para la identificación de genes expresados diferencialmente se debe realizar una anotación genómica, mediante un alineamiento de las secuencias de los genes que se fueron iden-

*al.*, 2017) are used to visualize, through hierarchical trees, the GO terms that are significantly expressed. Another approach can be the use of primers or primers of specific genes that have previously shown mechanisms of action of interest to quantify the gene expression through qPCR or ddPCR. This technique avoids the transcriptomic study of an organism.

Several reports have been published worldwide about the use of transcriptomics focused on understanding the biological control mechanisms during the plant-pathogen-BCA interaction by conducting studies of the gene expression in BCA-M (in the presence of a phytopathogen *in vitro* or in the field); the regulation of the gene expression in the pathogen or in the host plant (in the presence of the BCA-M or its metabolites); the impact of the phytopathogens on the gene expression profiles; and the modulation of these profiles by the presence or absence of an BCA-M. For example, Duke *et al.* (2017) reported that *Brassica napus* (canola) is greatly affected by *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. However, when *Pseudomonas chlororaphis* PA23 was inoculated in canola in the presence of *S. sclerotiorum*, the infection rate was reduced by 91%. This result was associated with the transcriptional reprogramming in canola, *i.e.*, the plants infected with *S. sclerotiorum* positively regulated approximately 8000 genes, while the preventive treatment with *P. chlororaphis* PA23 reduced 16 times the expression of the genes previously regulated by the phytopathogen. In addition, in the absence of the pathogen, *P. chlororaphis* PA23 caused the regulation of defense genes in canola, which are involved in the induced systemic response and production of reactive oxygen species.

**Metabolomic studies to identify potential mechanisms of action of BCA-M.** As a scientific



tificados como significativamente expresadas (Carmacho *et al.*, 2009). En seguida, se procede a identificar las familias de los genes y/o sus productos mediante softwares como HMMER (Potter *et al.*, 2018), InterProScan (Mitchell *et al.*, 2015) y SignalP (Petersen *et al.*, 2011). Por último, se realiza un análisis de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés), donde permite agrupar genes por procesos biológicos, función molecular, componente celular y el análisis de rutas metabólicas (KEGG) (Kanehisa *et al.*, 2004) y otras agrupaciones de mayor complejidad (PANTHER) (Mi *et al.*, 2013), y así herramientas como AgriGO (Tian *et al.*, 2017) permiten visualizar -mediante arboles jerárquicos- los términos GO significativamente expresados. Otro enfoque puede ser el empleo de primers o iniciadores de genes específicos previamente identificados con mecanismos de acción de interés para su empleo en qPCR o ddPCR para cuantificar la expresión génica. Esta técnica evita el estudio transcriptómico de un organismo.

Diversas investigaciones han sido publicadas a nivel mundial sobre el uso de la transcriptómica para el entendimiento de mecanismos de control biológico durante la interacción planta-patógeno-ACB mediante el estudio de los perfiles de expresión génica en el ACB-M (en presencia del fitopatógeno *in vitro* o en campo); regulación de la expresión de genes en el fitopatógeno o en la planta hospedera (en presencia del ACB-M o sus metabolitos); impacto del fitopatógeno sobre los perfiles de expresión génica de su hospedero; y la modulación de estos perfiles por la presencia o ausencia del ACB-M. Por ejemplo, Duke *et al.* (2017) reportaron que el cultivo de *Brassica napus* (canola) es fuertemente afectado por *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal de la pudrición del tallo de canola; sin embargo, la inoculación de *Pseudomonas chlororaphis* PA23 a la canola en presencia de *S. sclerotiorum*, redujo la tasa de infección en 91%. Lo

approach based on data to detect and quantify hundreds of metabolites by differential analyses (Lloyd *et al.*, 2015), metabolomics is ideal for analyzing complex interactions at the metabolic level during plant-microorganisms-environment interactions.

The metabolomic studies are based, in the first place, on establishing the experimental condition for the study (Figure 2) by which the strategy of sample preparation will be established (focused on the type of compounds to be detected, including extractions with organic solvents or solid-phase extractions), followed by sample preparation, either by concentration or purification (Mhlongo *et al.*, 2018). Then, the separation and detection of metabolites of interest is carried out using gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE) coupled to mass spectrometry (MS) (Naz, 2014). CE separates the compounds depending on the charge and size and provides high-resolution power. CE-MS is mainly used for primary-intermediate metabolic pathways and is usually coupled to a TOF mass analyzer (Ramautar *et al.*, 2016). In recent years, MS imaging (MSI) has evolved and has been used in different metabolic studies to obtain the distribution of compounds in tissue areas (cells, tissue, or specific sections) (Mhlongo *et al.*, 2018). Compared to other traditional molecular imaging techniques, MSI makes it possible to obtain more information by providing the distribution of characteristics of a wide range of metabolites at high resolution (Schwamborn, 2012).

Metabolomics, the same as other omics tools, produces a large amount of complex data which require storage and processing instruments. These data can be processed using free statistical tools such as MarVis1, Mzine, XCMS, MAVEN, Metaboanalyst and MetAlign (Benton *et al.*, 2008), or commercial programs: Markerlynx (Waters),

anterior, se asoció a la reprogramación transcripcional en la canola, *i.e.* las plantas infectadas con *S. sclerotiorum* regularon positivamente aproximadamente 8000 genes, mientras que el tratamiento preventivo con *P. chlororaphis* PA23 disminuyó 16 veces la expresión de los genes previamente regulados por el fitopatógeno. Además, en ausencia del patógeno, se observó que *P. chlororaphis* PA23 causó la regulación de genes de defensa en la canola, los cuales están involucrados en la respuesta sistémica inducida y la producción de especies reactivas de oxígeno.

**Estudios metabolómicos para la identificación de potenciales mecanismos de acción de ACB-M.** La metabolómica, como un enfoque científico basado en datos para detectar y cuantificar cientos de metabolitos por análisis diferencial (Lloyd *et al.*, 2015), es ideal para el análisis de interacciones complejas, a nivel de metabolitos, durante las interacciones planta-microorganismos-ambiente.

Los estudios metabolómicos se basan primeramente en establecer la condición experimental para el estudio (Figura 2), con lo cual se definirá la estrategia de preparación de la muestra (enfocada el tipo de compuestos a detectar, incluyendo extracciones con solventes orgánicos o extracción de fase sólida), seguido por la preparación de la muestra ya sea concentrándola o purificándola (Mhlongo *et al.*, 2018). Posteriormente, se realiza una separación y detección de metabolitos de interés a través de cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés), cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés), o la electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) acopladas a la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) (Naz, 2014). La CE separa los compuestos según la carga y el tamaño, y ofrece un alto poder de resolución. La CE-MS se utiliza principalmente para vías metabólicas primarias-intermedias, y por lo general se acopla a un analizador de masas TOF (Ramautar *et*

profile creation solutions (Shimadzu), Mass Profiler. pro (Agilent) and metabolic profiler (Bruker) (Mhlongo *et al.*, 2018). Multivariate statistical tools are also used to reduce data dimensionality, variable discrimination, and to form groups based on shared characteristics among samples (*i.e.*, n-strains); part of these are the Principal Component Analysis and Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) (Worley and Powers, 2013). Finally, the metabolites are annotated and identified using complementary databases which contain mass ranges, compound name and structures, statistical models, and metabolic pathways (Fukushima and Kusano, 2013). Recently, several databases have been developed that contain statistical and metabolomic tools based on MS or nuclear magnetic resonance, *i.e.*, MeRy-B, MeltDB, and SetupX (Fukushima and Kusano, 2013).

The addition of metabolomic approaches to understanding the mechanisms of action of the BCA-M are highly valuable for the agricultural sector due to the wide diversity of metabolites produced by the BCA-M with high agro-biotechnological potential, and the knowledge of the metabolites involved in phytopathogens biological control during the BCA-host-phytopathogen-environment interaction. For example, Vinale *et al.* (2014), using metabolomic approaches, identified a new metabolite produced by *Trichoderma harzianum*, called isoharzianic acid, which inhibits the growth of phytopathogens such as *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. The isoharzianic acid also improves tomato seed germination and induces systemic resistance in plants. Similarly, other metabolites associated with biological control were reported for *Trichoderma*, such as hetelidic acid, sorbicilinol, trichodermanone C, giocladic acid and bisorbicilinol (Kang *et al.*, 2011).

It is essential that in Mexico important agricultural producer support be strengthened

*al.*, 2016). En los últimos años, la imagenología de MS (MSI, por sus siglas en inglés) ha avanzado y se ha aplicado en diferentes estudios metabólicos que proporciona la distribución de compuestos en superficie tisular (células, tejido o secciones específicas) (Mhlongo *et al.*, 2018). En comparación con otras técnicas tradicionales de imagenología molecular, la MSI permite obtener mayor información al proporcionar una distribución de características con alta resolución para una amplia gama de metabolitos (Schwamborn, 2012).

La metabolómica, como otras herramientas ómicas, genera grandes cantidades de datos complejos que requieren instrumentos de almacenamiento y procesamiento. Lo anterior se puede procesar mediante herramientas estadísticas gratuitas como MarVis1, Mzine, XCMS, MAVEN, Metaboanalyst y MetAlign (Benton *et al.*, 2008); así como programas comerciales: Markerlynx (Waters), soluciones de creación de perfiles (Shimadzu), Mass Profiler.pro (Agilent) y perfilador metabólico (Bruker) (Mhlongo *et al.*, 2018). Además, se utilizan herramientas estadísticas multivariadas para reducir la dimensionalidad de los datos, la discriminación de variables, y agrupar mediante características compartidas entre muestras (*i.e.* n-cepas); dentro de los cuales se encuentran los análisis de componentes principales y el análisis discriminante de proyección ortogonal a estructuras latentes (OPLS-DA, por sus siglas en inglés) supervisado (Worley y Powers, 2013). Por último, se anotan e identifican los metabolitos mediante el uso de bases de datos complementarias que incorporan espectros de masas, nombres y estructuras de compuestos, modelos estadísticos y rutas metabólicas (Fukushima y Kusano, 2013). Recientemente, se han desarrollado varias bases de datos que incorporan herramientas estadísticas y metabolómicas basadas en la MS o resonancia magnética nuclear, *i.e.* MeRy-B, Mel-tDB y SetupX (Fukushima y Kusano, 2013).

for cutting-edge scientific research focused on the polyphasic taxonomic affiliation of BCA-M and the integrative study of the knowledge of the mechanisms of action of those agents during the interaction with the host plant, the phytopathogen, and the environment. This will strengthen the development, innovation, and success of the use of formulated and registered bioproducts and thus provide a sustainable and ecological alternative to benefit crop health.

**Agroecological perspectives of BCA-M supported by omics sciences.** The use of BCA-M is a functional and economically viable alternative for controlling phytopathogens. However, it is important to create and strengthen regional stocks to identify potential BCA-M and delve into the study of their mechanisms of action under field conditions, since this will make it possible to know with a greater degree of certainty what the diverse aspects that impact their establishment and functionality are, such as specific suppression actions, as well as the action threshold density, population dynamics, interspecific competence and mechanisms of physicochemical adaptation to the edaphic environment and plant. This knowledge would help establish doses, frequency, and multiplication-application substrates.

Among the aspects identified that are determinant to increase the efficiency of the BCA-M actions in the field, is the activation of the induced systemic response (ISR) through the recognition of microorganisms-associated molecular patterns (MAMPs) to pathogens (PAMPs), or damage (DAMPs) (Figure 2). This kind of signal in plants makes it possible to detect the pathogen and reduce its colonization in the infection spot, and even activate the systemic mechanisms in the plant's distal tissues (Burketova *et al.*, 2015). Thus, ISR is a plant status which, through biotic factors

La incorporación de enfoques metabolómicos para entender los mecanismos de acción de los ACB-M son de gran valor para el sector agrícola, debido a la amplia diversidad de metabolitos producidos por los ACB-M con alto potencial agrobiotecnológico, así como el conocimiento de los metabolitos implicados en el control biológico de fitopatógenos durante la interacción ACB-hospedero-fitopatógeno-ambiente. Por ejemplo, Vinale y colaboradores (2014), a través de enfoques metabolómicos, identificaron la producción de un nuevo metabolito producido por *Trichoderma harzianum*, nombrado como ácido isoharziánico, el cual inhibe el crecimiento de fitopatógenos como: *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*. Además, el ácido isoharziánico mejora la germinación de semillas de jitomate e induce resistencia sistémica en plantas. De forma similar, otros metabolitos asociados al control biológico fueron reportados para *Trichoderma*, tales como: ácido hetelídico, sorbicilinol, tricodermanona C, ácido gliocládico y bisorbicilinol (Kang *et al.*, 2011).

Es primordial que en México un importante productor agrícola, se fortalezcan los apoyos a la investigación científica de vanguardia enfocada a la afiliación taxonómica polifacética de ACB-M, y el estudio integrativo del conocimiento de los mecanismos de acción de dichos agentes durante la interacción con la planta hospedera, el fitopatógeno, y ambiente. Lo anterior, permitirá potenciar el desarrollo, innovación, y el éxito del uso de bio-productos formulados y registrados con el fin de proporcionar una alternativa ecológica sustentable que beneficien la sanidad de los cultivos.

**Perspectivas agroecológicas de ACB-M con sustento en ciencias ómicas.** El uso de ACB-M es una alternativa funcional y económicamente viable para el control de fitopatógenos. Sin embargo, es fundamental realizar y fortalecer inventarios regionales

(*i.e.*, BCA-M) or chemicals, protects itself against continuous and future phytopathogen attacks (Ku'c, 1982). This process was first reported when the phytopathogen came into contact with the root, but studies about the colonization of resistance inductors through foliar applications have proposed the initial mechanisms of that resistance. For example, Lamdan *et al.* (2015) reported that the BCA belonging to the *Gliocladium virens* and *G. atroviride* species interact with the plant and the pathogen, thereby promoting the plant's growth and inducing a systemic response through proteins that are secreted by these fungi, which reduces the disease in the aerial parts of the plant. In this way, microbial elicitors induce the systemic response and act as endogenous or exogenous activators by reprogramming the resistance genes (Gupta and Bar, 2020). Ergosterol, the main component of fungal cell membranes and action substrate of many chemical fungicides, has acted as a resistance inductor in tomato and tobacco (Granado *et al.*, 1995; Vatsa *et al.*, 2011). On the other hand, host and non-host plants of *Cladosporium fulvum* (tomato pathogen) showed that the CfHNN11 gene induces a hypersensitive response in tomato and tobacco (Xu *et al.*, 2012), which coincides with the report of Zhang *et al.* (2013), who mentioned that the *Sclerotinia sclerotiorum* protein elicitor SCFE1 induced immunity through PAMP in *Arabidopsis thaliana*. Nevertheless, compared to bacteria and oomycetes elicitors, the fungal elicitors are not yet totally understood, and the function of those detected so far is still unknown, so the need to conduct further studies prevails (Liu *et al.*, 2013).

In this way, healthy plants can be treated with systemic response inductors, but since they are not universal, more research processes are needed. To date, the induction of preventive response in plants is achieved with BCA-M to sensitize the host to respond quickly, strong, lasting, and with the least

para identificar potenciales ACB-M y profundizar sobre sus mecanismos de acción bajo condiciones de campo, lo que permitirá identificar con mayor certeza diversos aspectos que impactan en su establecimiento y funcionalidad, tales como acciones específicas de supresión, así como densidad de umbrales de acción, dinámicas poblacionales, competencia inter-específica y mecanismos de adaptación físico-química al entorno edáfico y planta. Este conocimiento permitiría establecer dosis, frecuencia y sustratos de multiplicación – aplicación.

Entre los aspectos identificados como determinantes para incrementar la eficiencia de acción de los ACB-M en campo destaca la activación de la respuesta sistémica de la planta (ISR, por sus siglas en inglés), mediante el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), a patógenos (PAMPs), o por daño (DAMPs) (Figura 2). Esta señalización en la planta permite detectar al patógeno y reducir su colonización en el sitio de infección, incluso activar mecanismos sistémicos en tejidos distales de la planta (Burketova *et al.*, 2015). Así, la IRS es un estado de la planta que, mediante factores bióticos (i.e. ACB-M) o químicos, le provee protección contra sostenidos y futuros ataques de fitopatógenos (Ku'c, 1982). Este proceso fue primeramente reportado cuando el fitopatógeno estaba en contacto con la raíz; sin embargo, estudios sobre la colonización de inductores de resistencia mediante aplicaciones foliares han propuesto los mecanismos iniciales de dicha resistencia. Por ejemplo, Lamdan y colaboradores (2015) reportaron que los ACB pertenecientes a la especie *Gliocladium virens* y *G. atroviride* interactúan con la planta y patógeno, promoviendo el crecimiento de las plantas e induciendo respuesta sistémica, mediante proteínas secretadas por dichos hongos, lo cual reduce la enfermedad en las partes aéreas de la planta. Así, el empleo de elicitores microbianos permite inducir la respuesta sis-

waste of the energy required when a phytopathogen attack occurs (Mauch-Mani *et al.*, 2017). This is because when plants are growing under field conditions, they are continually exposed to different stimuli of abiotic and biotic type (bacteria, fungi, herbivore, oomycetes, viruses, arthropods, among others), which could activate defenses in the plants and influence the improvement of their response capacity by maintaining basal levels of resistance or a biochemical memory (Mauch-Mani *et al.*, 2017). So, when a plant receives the stimulus, changes occur at the physiological, transcriptional, metabolic, and epigenetic levels, an event which is known as a preventive response induction phase for the plant to develop a faster and stronger response to a potential attack, since the plant was already prepared. This kind of preventive resistance can last and be kept during the plant's life cycle, and the induction of preventive response can be considered transgenerational (Mauch-Mani *et al.*, 2017). However, to understand the molecular mechanisms that induce a preventive response, two potential mechanisms are suggested: i) epigenetic changes in DNA methylation and modification of histones which may carry stress memories and trigger immune responses, and ii) accumulation of kinase proteins activated by mitogens (MPK) (Espinosa *et al.*, 2016).

On the other hand, another approach in the study of BCA-M is the use of secondary metabolites (SM), which is considered as a green solution in agriculture since most of those BCA can secrete their metabolites (Köhl *et al.*, 2019). In this way, the bioactive metabolites (polyketides, non-ribosomal peptides, hybrid metabolites of peptide-peptide, terpenes, siderophores, lytic enzymes, among others) are isolated and purified (Figures 1 and 2). These metabolites are of great interest not only for the scientific community but also for the agro-biotechnology industry because of their



témica y funcionan como activadores endógenos o exógenos mediante la reprogramación de los genes de resistencia (Gupta y Bar, 2020). El ergosterol, un componente principal de la membrana fúngica y sustrato de acción de muchos fungicidas químicos, ha funcionado como inductor de la resistencia en jitomate y tabaco (Granado *et al.*, 1995; Vatsa *et al.*, 2011). Por otra parte, en plantas hospederas y no hospederas de *Cladosporium fulvum* (patógeno del jitomate), se encontró que el gen CfHNN1 es capaz de inducir la respuesta hipersensible en jitomate y tabaco (Xu *et al.*, 2012), similar a lo reportado por Zhang y colaboradores (2013), quienes mencionaron que la proteína elicitora SCFE1 de *Sclerotinia sclerotiorum* indujo la inmunidad por PAMP en *Arabidopsis thaliana*. No obstante, en comparación con elicitores de bacterias y oomicetos, los elicitores fúngicos continúan sin ser comprendidos en su totalidad, y aquellos detectados hasta ahora se desconoce su función, por lo que prevalece su importancia para ser investigados (Liu *et al.*, 2013).

De esta manera, las plantas sanas pueden ser tratadas con inductores de respuesta sistémica; sin embargo, éstos no resultan ser universales, por lo cual se necesitan más procesos de investigación. Actualmente, la inducción de respuesta preventiva en plantas es abordada con ACB-M con la finalidad de sensibilizar al hospedero para responder de forma rápida, fuerte, duradera, y que el gasto de energía requerido sea menor ante un fitopatógeno (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Lo anterior, debido a que las plantas en crecimiento en condiciones de campo están constantemente expuestas a diferentes estímulos de tipo abióticos y bióticos (bacterias, hongos, herbívoros, oomicetos, virus, artrópodos, entre otros) que podrían activar defensas en las plantas, e influir para mejorar su capacidad de respuesta manteniendo niveles basales de resistencia o una memoria bioquímica (Mauch-Mani *et al.*,

biological activities against phytopathogens, such as hormones or carriers of chemical elements during biopesticide and biofertilizer production (Woo *et al.*, 2014). SM are highly diverse in chemical structure, but the biosynthesis pathways are related to the primary metabolism, such as the pathway of shikimate acid, acetyl Co-A, sugar derivatives or amino acids (Pott *et al.*, 2019). Understanding these metabolic pathways is very important for the innovation of products focused on phytopathogens control, either using traditional techniques or those labeled as omics.

A classic holistic approach that has been recently re-valuated with the advent of new technologies as metagenomics is the function of suppressive soils, whose microbial community composition keeps the phytopathogens present from infecting or multiplying in the plant of interest. Those soils can be divided into two categories: i) general suppressive soils, with a high content of microbial mass but low suppression levels; and ii) specific suppressive soils, with a high concentration of one or more microbial species and high levels of plant protection against pathogens (Mousa and Raizada, 2016). Shen *et al.* (2015) reported that the composition of the microbial community of the rhizosphere of chill pepper plants inoculated with *B. amyloliquefaciens* (a beneficial bacterium) induced *Fusarium* suppression and increased the potentially stimulating bacterial diversity (acidobacteria, firmicutes, *Leptosphaeria* and *Phaeosphaeriopsis*). However, there are no recent studies about suppressive soils, especially where BCA-M are continually applied for phytopathogen management, so this kind of studies is a challenge for the agro-biotechnological sector focused on ensuring plant health in a sustainable and integrating way by using highly accurate approaches as the omics sciences.

2017). Así, cuando la planta percibe el estímulo, se producen cambios a nivel fisiológico, transcripcional, metabólico y epigenético, conocido como fase de inducción de respuesta preventiva, para que la planta desarrolle una respuesta más rápida y fuerte al potencial ataque, dado que ya estaba previamente preparada. Este tipo de resistencia previa puede ser duradera y mantenerse durante el ciclo de vida de la planta, incluso esta inducción de respuesta preventiva puede considerarse como transgeneracional (Mauch-Mani *et al.*, 2017). No obstante, para el entendimiento de los mecanismos moleculares de la inducción de respuesta preventiva, se sugieren dos mecanismos potenciales: i) cambios epigenéticos en la metilación del ADN y las modificaciones de histonas que pueden ser portadoras de memoria de estrés y desencadenantes de respuestas inmunes, y ii) la acumulación de proteína quinasas activadas por mitógenos (MPK) (Espinás *et al.*, 2016).

Por otra parte, otro de los enfoques en el estudio de los ACB-M es el empleo de sus metabolitos secundarios (MS), considerado como una solución verde en la agricultura ya que la mayoría de dichos ACB poseen la capacidad de secretar sus metabolitos (Köhl *et al.*, 2019). De esta manera, los metabolitos bio-activos (poliquétidos, péptidos no ribosomales, metabolitos híbridos de péptido-péptido, terpenos, sideróforos, enzimas líticas, entre otros) son aislados y purificados (Figura 1 y 2). Estos metabolitos resultan de gran interés no sólo para la comunidad científica sino también para la industria agro-biotecnológica, debido a las actividades biológicas que poseen contra fitopatógenos, como hormonas o transportadores de elementos químicos durante la producción de bioplaguicidas y biofertilizantes (Woo *et al.*, 2014). Los MS son altamente diversos en estructura química, pero las vías de biosíntesis se relacionan con el metabolismo primario, como la ruta del ácido shikímato, acetil Co-A, los derivados de azúcares o aminoácidos (Pott *et al.*,

The development and innovation of the agrobiotechnology sector is decisive for the extensive and successful implementation of the BCA-M in Mexico, yet it represents a great scientific challenge. There are multiple studies about BCA-M used in phytopathogens management, but further integrative and creative studies are still needed to develop or innovate profitable, effective, and ecological alternatives to strengthen the use of high-quality and safe biopesticide bioproducts required for plant health in the world.

## CONCLUSIONS

The massive use of BCA-M in Mexico and around the world requires a greater diversity of registered and marketed biopesticides. However, it is necessary to abandon the reductionist concept of implementation by using specimens from microbial culture collections, and the unrestricted regional scalability from the agroecological environment. It is necessary to create and have unlimited access to technical and scientific information that supports the relative effectiveness to the complex interactions with biotic and/or abiotic factors in the agroecosystem. This will permit the establishment of more effective development, innovation, and adoption processes of these agrobiotechnological strategies. In Mexico and other countries, the systemic and holistic research of BCA-M must be strengthened with the integration of modern approaches based on the emergence and development of the omics sciences, which can only be enhanced with highly skilled human capital and specialized scientific infrastructure. This will enable the development of more effective and cost-effective BCA-M through the bioprospection of new BCA-M and a detailed study of their taxonomic affiliation and mechanisms of action

2019). El entendimiento de estas rutas metabólicas es de gran importancia para la innovación de bio-productos enfocados al control de fitopatógenos, a través de técnicas tradicionales o aquellas catalogadas como ómicas.

Un enfoque clásico holístico, pero recientemente revalorado con el advenimiento de nuevas tecnologías como la metagenómica es el funcionamiento de suelos supresivos, cuya composición de la comunidad microbiana impide que los fitopatógenos presentes infecten o se multipliquen en la planta de interés. Dichos suelos pueden dividirse en dos categorías: i) suelos supresivos generales, los cuales tienen un alto contenido de biomasa microbiana, pero resulta en bajos niveles de supresión, y ii) los suelos supresivos específicos, que tiene una alta concentración de uno o más especies microbianas y resulta en altos niveles de protección de la planta contra patógenos (Mousa y Raizada, 2016). Shen y colaboradores (2015), reportaron que la composición de la comunidad microbiana de la rizósfera de plantas de chile inoculada con *B. amyloliquefaciens* (bacteria benéfica) indujo la supresión de *Fusarium* y aumentó la diversidad bacteriana potencialmente estimulantes (Acidobacterias, Firmicutes, *Lep-tosphaeria* y *Phaeosphaeriopsis*). Sin embargo, hace falta mayor número de estudios actuales sobre suelos supresivos, en especial donde se realizan aplicaciones constantes de ACB-M para el manejo de fitopatógenos, por lo que este tipo de estudios representa un reto para el sector agro-biotecnológico enfocado en garantizar la sanidad vegetal de forma sostenible e integradora, utilizando enfoques altamente precisos como las ciencias ómicas.

El desarrollo e innovación del sector agro-biotecnológico es determinante para la implementación extensiva y exitosa de ACB-M en México, pero representa un gran reto científico. Existen múltiples estudios de ACB-M para el manejo de fitopatógenos, pero aún requieren estudios

at the agroecosystem level. This can be achieved based on transdisciplinary thematic areas, such as microbiomes, metapopulation dynamics, functional relations at the community level, and gene-metabolic interaction in the plant-microorganisms-environment system under an adaptative and evolutionary environment. The systemic and comprehensive understanding of BCA-M in the agroecosystems, the establishment of researcher networks and biotechnological companies, as well as knowledge dissemination, will enhance the adoption of BCA-M in the Mexican cropping fields, and contribute to plant health and food security in a sustainable, economically viable and biosafety way.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) for funding the project PROFAPI 2020\_0013 “*Bacillus* sp. TSO9: *Afiliación taxonómica a nivel del genoma e identificación de genes asociados a la promoción del crecimiento en el trigo*”. They also thank the valuable suggestions from Dr. Gustavo Mora Aguilera and the panel of anonymous reviewers, which enriched the content of this manuscript.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

integradores y creativos enfocados a la generación o innovación de alternativas rentables, efectivas y ecológicas para potenciar el uso de bioproductos bioplaguicidas con la calidad y seguridad que demanda la sanidad vegetal a nivel mundial.

## CONCLUSIONES

El empleo masivo de ACB-M en nuestro país y en el mundo demanda mayor diversidad de bioplaguicidas registrados y comercializados. Sin embargo, es necesario abandonar la concepción reduccionista de la implementación mediante el uso de especímenes de colecciones microbianas y su escalabilidad regional irrestricta del entorno agroecológico. Es necesario generar y disponer de un amplio acceso a información técnica-científica que soporte la efectividad relativa a las complejas interacciones con factores bióticos y/o abióticos del agroecosistema. Esto permitirá detonar procesos de generación, innovación y adopción más eficiente de estas estrategias agrobiotecnológicas. En México y a nivel internacional, la investigación sistémica y holística de ACB-M debe fortalecerse con la integración de enfoques vanguardistas a partir del surgimiento y desarrollo de las ciencias ómicas, las cuales solo podrán ser potenciadas con capital humano altamente capacitado e infraestructura científica especializada. Esto permitiría desarrollar la nueva generación de ACB-M eficientes y costo-efectivos mediante la bioprospección de nuevos ACB-M y el estudio detallado de su afiliación taxonómica y sus mecanismos de acción a nivel de los agroecosistemas. Lo anterior basado en ejes temáticos transdisciplinarios, tales como microbiomas, dinámicas metapoblacionales, relaciones funcionales nivel comunidad, e interacción génica-metabólica en el sistema planta-microorganismos-ambiente en un contexto adaptativo y evolutivo. El entendimiento sistémico e integral de ACB-M en los agroecosistemas, la generación de redes de investigadores y empresas biotecnológicas, y la divulgación del conocimiento permitirá potenciar la adopción de ACB-M en el campo mexicano, contribuir a la sanidad vegetal y seguridad alimentaria de forma sostenible, económicamente viable y biosegura.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON) por el financiamiento del proyecto PROFAPI 2020\_0013 “*Bacillus* sp. TSO9: Afiliación taxonómica a nivel del genoma e identificación de genes asociados a la promoción del crecimiento en el trigo”. Además, agradecemos las valiosas sugerencias de Gustavo Mora Aguilera y el panel de revisores anónimos, las cuales enriquecieron el presente manuscrito.

## LITERATURA CITADA

- Agrawal P, Khate S, Gupta M, Sain N and Mohanty D. 2017. RiPPMiner: a bioinformatics resource for deciphering chemical structures of RiPPs based on prediction of cleavage and cross-links. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W80–W88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx408>
- Aguilar-Marcelino L, Mendoza-de-Gives P, Al-Ani LKT, López-Arellano ME, Gómez-Rodríguez O, Villar-Luna E and Reyes-Guerrero DE. 2020. Using molecular techniques applied to beneficial microorganisms as biotechnological tools for controlling agricultural plant pathogens and pest. Pp: 333–349. *In: Sharma V, Salwan R, and Al-Ani LKT (eds). Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture.* <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818469-1.00027-4> 425p.
- Anders S, Pyl PT and Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with highthroughput sequencing data. *Bioinformatics* 31(2):166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> (Consulta, Mayo, 2020).
- Ansari MZ, Yadav G, Gokhale RS and Mohanty D. 2004. NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases. *Nucleic acids research* 32(2): W405–W413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh359>
- Antipov D, Korobeynikov A, McLean JS and Pevzner PA. 2016. HYBRIDSPADES: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics* 32(7):1009–1015, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>
- Arredondo-Bernal HC y Rodríguez-del Bosque LA. 2015. Casos de control biológico en México. Editorial Colegio de Postgraduados. Vol. 2. Texcoco, México. 413 p.
- Ayala-Zermeño MA, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, Serna-Domínguez MG, Arredondo-Bernal HC and Montesinos-Matías R. 2015. Characterization of entomopathogenic fungi used in the biological control programme of *Diaphorina citri* in Mexico. *Biocontrol Science and Technology* 25(10): 1192–1207. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1041878>



- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formisano K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A and Zagnitko O. 2008. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9(75): 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA and Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology* 19(5): 455-477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Benton HP, Wong DM, Trauger SA and Siuzdak G. 2008. XCMS2: processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization. *Analytical Chemistry* 80(16): 6382-6389. <https://doi.org/10.1021/ac800795f>
- Bernal JS and Quezada JR. 1999. Perspectivas y desafíos para el control biológico en México. *Vedalia* 6: 3-14.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH and Weber T. 2019. AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* 47(1): W81-W87. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz310>
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borodovsky M and Lomsadze A. 2011. Eukaryotic gene prediction using GeneMark.hmm-E and GeneMark-ES. *Current protocols in bioinformatics* 35(1): 4.6.1-4.6.10. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0406s35>
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P and Pachter L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34: 525-527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Burketova L, Trda L, Ott PG and Valentova O. 2015. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances* 33(6):994-1004. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.004>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K and Madden TL. 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Carrion G y Desgarenes D. 2012. Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nemátodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(1): 86-90. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a9.pdf>
- Chaudhuri RR, Loman NJ, Snyder LAS, Bailey CM, Stekel DJ and Pallen MJ. 2008. xBASE2: a comprehensive resource for comparative bacterial genomics. *Nucleic Acids Research* 36(1): D543-D546. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm928>
- Darling AC, Mau B, Blattner FR and Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research* 14:1394-1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- De León SG y Mier T. 2010. Visión general de la producción y aplicación de bioplaguicidas en México. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* 10(20): 37-63. <https://biblat.unam.mx/hevila/Sociedadesruralesproducciony-medioambiente/2010/vol10/no20/2.pdf>
- De los Santos-Villalobos S, Kremer J M, Parra-Cota, FI, Hayano-Kanashiro AC, García-Ortega LF, Gunturu SK, Tiedje JM, He SY, Peña-Cabriales JJ. 2018. Draft genome of the fungicidal biological control agent *Burkholderia anthina* strain XXVI. *Archives of Microbiology* 200:803-810. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1490-6>
- De los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI, Herrera-Sepúlveda A, Valenzuela-Aragón 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. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>
- De los Santos-Villalobos S, Robles-Montoya 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*) in the Yaqui Valley, Mexico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69(12): 3939-3945. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>
- Delcher AL, Bratke KA, Powers EC and Salzberg SL. 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* 23(6): 673-679. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm009>
- Delgado Ortiz JC, Beltrán Beache M, Cerna Chávez E, Aguirre Uribe LA, Landero Flores J, Rodríguez Pagaza Y y Ochoa Fuentes YM. 2019. *Candidatus Liberibacter solanacearum* patógeno vascular de solanáceas: Diagnóstico y control. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 22: 1-12. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.177>
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S and Gingeras TR. 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1): 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Duke KA, Becker MG, Girard LJ, Millar JL, Fernando WGD, Belmonte MF and De Kievit TR. 2017. The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. *BMC Genomics* 18: 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3848-6>
- Ehling-Schulzn M, Lereclus D and Koehler TM. 2019. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum* 7(3): GPP3-0032. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018>
- Espinosa NA, Saze H and Saijo Y. 2016. Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 1201-1201. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01201>
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 337-359. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-5>



- FAO. 2018. El futuro de la alimentación y la agricultura: Vías alternativas hacia el 2050. Versión resumida. Rome. 64 pp. <http://www.fao.org/3/CA1553ES/ca1553es.pdf> (Consulta, Mayo 2020).
- Franco-Navarro F, Cid del Prado-Vera I y Romero-Tejeda, ML. 2013. Aislamiento y Potencial Parasítico de un Aislamiento Nativo de *Pochonia chlamydosporia* en Contra de *Nacobbus aberrans* en Frijol. Revista Mexicana de Fitopatología 30(2): 101-114. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n2/v30n2a1.pdf>
- Fukushima A and Kusano M. 2013. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. Frontier in Plant Science 4: 73. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00073>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Allende R, Balderas K, Patiño M, Trejo M, Wong MA, Rayo E, Isauro D and Jurado C. 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. Electronic Journal of Biotechnology 16(3): 5-5. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-6>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Balderas-Ruiz KB, Muñoz-Celaya AL, Mezo-Villalobos M y Arroyo-Colín J. 2015. Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas 18(1): 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.005>
- Gallou A, Serna-Domínguez MG, Berlanga-Padilla AM, Ayala-Zermeño MA, Mellín-Rosas MA, Montesinos-Matías R and Arredondo-Bernal HC. 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Dia-phorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. Fungal biology 120(3): 414-423. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.009>
- García-Juárez HS, Ortiz-García CF, Salgado-García S, Valdez-Balero A, Silva-Rojas HV, and Ovalle-Saenz WR. 2016. Immunodetection of the *Leifsonia Xyli* ssp. *xyli* bacteria in commercial clones of *Saccharum* spp. in Tabasco, Mexico. Agro Productividad 9(3): 3-9. [https://www.colpos.mx/wb\\_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD\\_III\\_2016.pdf](https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD_III_2016.pdf)
- García-Nevárez G and Hidalgo-Jamison E. 2019. Efficacy of indigenous and commercial *Simplicillium* and *Lecanicillium* strains for controlling *Hemileia vastatrix*. Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 237-250. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-4>
- García-Núñez HG, Martínez-Campos AR, Hermosa-Prieto MR; Monte-Vázquez E, Aguilar-Ortigoza CJ and González-Esquível CE. 2017. Morphological and molecular characterization of native isolates of *Trichoderma* and its potential biocontrol against *Phytophthora infestans*. Revista Mexicana de Fitopatología 35(1): 58-79. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1605-4>
- Gill HK and Garg H. 2014. Pesticides: environmental impacts and management strategies. In: Larramendy ML and Solonneski S (eds.). Pesticides-toxic aspects. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/57399>
- Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villarnovo GLL and Hernández-Leal TI. 2017. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 172-183. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1708-1>
- Granado J, Felix G and Boller T. 1995. Perception of fungal sterols in plants-Subnanomolar concentrations of ergosterol elicits extracellular alkalisation in tomato cells. Plant Physiology 107: 485-490. <https://doi.org/10.1104/pp.107.2.485>
- Guerrero PVM, Blanco PAC, Guigón LC, Tamayo UCJ, Molina CFJ, Berlanga RDI, Carvajal ME and Ávila QGD. 2011. Competencia por nutrientes; modo de acción de *Candida oleophila* contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Revista Mexicana de Fitopatología 29 (2): 90-97. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v29n2/v29n2a1.pdf>
- Gupta R and Bar M. 2020. Plant Immunity, Priming, and Systemic Resistance as Mechanisms for *Trichoderma* spp. Biocontrol. Pp: 81-110. In: Sharma A. and Sharma P. (eds) *Trichoderma*. Rhizosphere Biology. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3321-1_5)
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N and Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29(8): 1072-1075. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hassan MM, Farid MA and Gaber A. 2019. Rapid identification of *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma longibrachiatum* using sequence-characterized amplified region markers. Egyptian Journal of Biological Pest Control 29 (13): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0113-0>
- Illa C, Pérez AA, Torassa M and Pérez MA. 2020. Effect of biocontrol and promotion of peanut growth by inoculating *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* under controlled conditions and field. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 119-131. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1910-6>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2017. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017 MEX-INEGI. EEC2.05-ENA-2017. <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/498> (Consulta, Mayo, 2020).
- Jagadeesan B, Gerner-Smidt P, Allard MW, Leuillet S, Winkler A, Xiao Y, Chaffron S, Vossen JVD, Tang S, Katase M, McClure P, Kimura B, Chai LC, Chapman J and Grant K. 2019. The Use of Next Generation Sequencing for Improving Food Safety: Translation into practice. Food Microbiology 79: 96-115. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.005>
- Jhonson AD, Handsaker RE, Pulit SL, Nizzari MM, O'Donnell CJ and andde Bakker PIW. 2008. SNAO: a web based tool for identification and annotation of proxy SNPs using hadmap. Bioinformatics 24(24): 2938-2939. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn564>
- Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R and García-Hernández JL. 2018. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2): 256-275. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1711-3>
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y and Hattori M. 2004. The KEGG resource for deciphering the ge-

- nome. *Nucleic Acids Research* 32: 277-280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh063>
- Kang D, Kim J, Choi JN, Liu KH and Lee CH. 2011. Chemotaxonomy of *Trichoderma* spp. using mass spectrometry-based metabolite profiling. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(1): 5-13. <https://doi.org/10.4014/jmb.1008.08018>
- Keller O, Kollmar M, Stanke M and Waack S. 2011. A novel hybrid gene prediction method employing protein multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 27(6): 757-763. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr010>
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R and Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcripts in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14(4):1-13. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg WJ. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontier in Plant Science* 10: 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH and Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Research* 27: 722-736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Kuč J. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32(11): 854-860. <https://doi.org/10.2307/1309008>
- Lagunes-Castro MS, López Monteon A, Ramos Ligonio A, Trigos A, Salinas A y Espinoza C. 2015. Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 87-94. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n1/2007-8080-rmfi-33-01-00087.pdf>
- Lamdan NL, Shalaby S, Ziv T, Kenerley CM and Horwitz BA. 2015. Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in induced systemic resistance. *Molecular Cell Proteomics* 14(4): 1054-1063. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046607>
- Langmead B and Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359. <https://www.nature.com/articles/nmeth.1923>
- Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS and Allende-Molar R. 2018. Effect of biocontrol and germinative inhibition of *Bacillus* spp. on zoospores of *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(2): 215-232. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Li B and Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12: 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Li H and Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25(14): 1754-1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li H. 2011. Improving SNP discovery by base alignment quality. *Bioinformatics* 27(8): 1157-1158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr076>
- Li R, Yu C, Li Y, Lam TW, Yiu SM, Kristiansen K and Wang J. 2009. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* 25(15): 1966-1967. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp336>
- Liu W, Liu J, Ning Y, Ding B, Wang X, Wang Z and Wan GL. 2013. Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant* 6(3): 605-620. <https://doi.org/10.1093/mp/sst015>
- Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-Kolthoff JP, Wang M, Sun Y, Wang L and Shao Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* 5: 14082. <https://doi.org/10.1038/srep14082>
- Lloyd N, Johnson DL and Herderich MJ. 2015. Metabolomics approaches for resolving and harnessing chemical diversity in grapes, yeast and wine. *Australian Journal of Grape Wine Research* 21(S1): 723-740. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12202>
- Love MI, Huber W and Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15: 550. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lozano-Alejo N, Guzmán-Plazola RA, Zavaleta-Mejía E, Aguilar-Rincón VH y Ayala-Escobar V. 2015. Etiología y evaluación de alternativas de control de la Marchitez del chile de árbol (*Capsicum annum* L.) en La Vega de Metztlán, Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(1): 31-53. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n1/2007-8080-rmfi-33-01-00031.pdf>
- Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G, Chen Y, Pan Q, Liu Y, Tang J, Wu G, Zhang H, Shi Y, Liu Y, Yu C, Wang B, Lu Y, Han C, Cheung DW, Yiu SM, Peng S, Xiaoqian Z, Liu G, Liao X, Li Y, Yang H, Wang J, Lam TW and Wang J. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short read de novo assembler. *Gigascience* 1(1): 18. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18>
- Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ. 2012. Rizobacterias aisladas del trópico húmedo con actividad antagonista sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, evaluación cuantitativa e identificación molecular. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30(1): 11-30. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v30n1/v30n1a2.pdf>
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* 17(1): 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E and Flors V. 2017. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology* 68: 485-512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132>
- Mazrou YSA, Makhlof AH, Elseehy MM, Awad MF and Hassan MM. 2020. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(4): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0207-8>
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP and Göker M. 2013. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14(60): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Mejía-Bautista MA, Reyes-Ramírez A, Cristobal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Borges-Gómez LC y Pacheco-Aguilar JR.

2016. *Bacillus* spp. in the control of wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(3): 208-222. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1603-1>
- Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, Labuschagne N and Dubery IA. 2018. The Chemistry of Plant-Microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and Induced Systemic Resistance. *Frontiers in Plant Science* 9: 112. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00112>
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT and Thomas PD. 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols* 8: 1551-1566. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.092>
- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Díaz-Castro A, Martínez-Rojero RD, Ariza-Flores R y Barrios-Ayala A. 2013. Biocontrol de la “Escoba de Bruja” del mango, con *Trichoderma* spp., en condiciones de campo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1): 1-12. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n1/v31n1a1.pdf>
- Mitchell A, Chang HY, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, López R, McAnulla C, McMenamin C, Nuka G, Pesseat S, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Rato C, Yong SY, Bateman A, Punta M, Attwood TK, Sigrist CJA, Redaschi N, Rivoire C, Xenarios I, Kahn D, Guyot D, Bork P, Letunic I, Gough J, Oates M, Haft D, Huang H, Natale DA, Wu CH, Orengo C, Sillitoe I, Mi H, Thomas PD and Finn R. 2015. The InterPro protein families datábase: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research* 43(D1): 1-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1243>
- Moriuchi R, Dohra H, Kanesaki Y and Ogawa N. 2019. Complete Genome Sequence of Bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and Reclassification of the Strains of the Genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* Based on Phylogenetic and Whole-Genome Sequence Analyses. *Frontiers in Microbiology* 10: 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00133>
- Mousa WK and Raizada MN. 2016. Natural disease control in cereal grains. Pp:1-7. *In*: reference module in Food Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00206-7>
- Naz S. 2014. Analytical protocols based on LC–MS, GC–MS and CE–MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis* 6(12): 1657–1677. <https://doi.org/10.4155/BIO.14.119>
- Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solis J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR, López-Alcocer E and Olalde-Portugal V. 2020. Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 146-159. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-2>
- ONU. 2018. La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe (LC/G.2681-P/Rev.3), Santiago. [https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/40155/24/S1801141\\_es.pdf](https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/40155/24/S1801141_es.pdf) (Consulta, Junio 2020).
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P and Tyson GW. 2015 CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research* 25: 1043 1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Peng Y, Leung HCM, Yiu SM, Chin FYL and IDBA-UD. 2012. a *de novo* assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28(11): 1420-1428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts174>
- Pérez-Moreno L, Belmonte-Vargas JR, Núñez-Palenius HG, Guzmán-Mendoza R y Mendoza-Celedón B. 2015. Sensibilidad de especies de *Sclerotinia* spp. y *Sclerotium cepivorum* a agentes de control biológico y fungicidas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 256-267. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00256.pdf>
- Pérez-Rojas F, León-Quipe J y Galindo-Cabello N. 2015. Actinomicetos Aislados del Compost y su Actividad Antagonista a Fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. *andigena* Hawkes). *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 116-139. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v33n2/2007-8080-rmfi-33-02-00116-en.pdf>
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G and Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Natural Methods* 8: 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Pott DM, Osorio S and Vallarino JG. 2019. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in Plant Science* 10: 835. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00835>
- Potter SC, Aurélien Luciani, Sean R Eddy, Youngmi Park, Rodrigo Lopez and Robert D Finn. 2018. HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W200–W204. <https://doi.org/10.1093/nar/gky448>
- Quinlan A and Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformática* 26(6): 841-2 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ and Oberlies NH. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products* 80(3): 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramautar R, Somsen GW and de Jong GJ. 2016. CE–MS for metabolomics: developments and applications in the period 2014–2016. *Electrophoresis* 38(1): 1–13. <https://doi.org/10.1002/elps.201600370>
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F and Peplies J. 2016. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32(6): 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Rios-Velasco C, Caro-Cisneros JN, Berlanga-Reyes DI, Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Salas-Marina MA, Villalobos-Pérez E and Guerrero-Prieto VM. 2016. Identification and antagonistic activity *in vitro* af *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34(1): 84-99. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-1>
- Rodríguez-Millán KA, Monreal Vargas CT, Huerta Díaz J, Soria Colunga JC y Jarquín Gálvez R. 2013. Aporte de microorganismos benéficos por la incorporación al suelo de residuos deshidratados de col (*Brassica oleracea* var



- capitata*) y su efecto en el pH. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31(1):29-44. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v31n1/v31n1a4.pdf>
- Rodríguez-Romero VM, Villanueva-Arce R, Trejo-Raya AB and Bautista-Baños S. 2019. Chitosan and *Pseudomonas fluorescens* extracts for *Alternaria alternata* control in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mexican Journal of Phytopathology* 37(2): 202-219. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1812-2>
- Rollano-Peñaloza OM y Mollinedo-Portugal P. 2017. Análisis bioinformático de Arn-Seq con una perspectiva para Bolivia. *Revista Boliviana de Química* 4(2): 50-55. [http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v34n2/v34n2\\_a02.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v34n2/v34n2_a02.pdf)
- Roser M. 2019. Pesticides. University of Oxford. <https://ourworldindata.org/pesticides> (Consulta, Mayo de 2020).
- Ruiz-Cisneros MF, Ornelas-Paz JJ, Olivas-Orozco GI, Acosta-Muñiz CH, Sepúlveda-Ahumada DR, Pérez-Corral DA, Rios-Velasco C, Salas-Marina MA and Fernández-Pavía SP. 2018. Effect of *Trichoderma* spp. and phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(3): 444-456. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1804-5>
- Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes DI, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE and Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 437-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Samaniego-Gaxiola JA, Pedroza-Sandoval A, Chew-Madineitia Y and Gaytán-Mascorro A. 2019. Reductive disinfestation, soil desiccation and *Trichoderma harzianum* to control *Phymatotrichopsis omnivora* in pecan tree nursery. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(2): 287-303. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-7>
- Serret-López M, Aranda-Ocampo S, Espinosa-Victoria D, Ortiz-Martínez LE and Ramírez-Razo K. 2021. Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(1): 1-20. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2007-2>
- Schmieder R and Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6): 863-864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schwamborn K. 2012. Imaging mass spectrometry in biomarker discovery and validation. *Journal of Proteomics* 75(16): 4990-4998. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.06.015>
- Sentausa E and Fournier PE. 2013. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 19(9): 790-795. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12181>
- Serrano-Carreón L, Balderas K, Wong MA, Rosas DR y Galindo-Fentanes EG. 2010. Biofungicidas para el control de la antracnosis del mango: Logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias* 208: 28-37. <https://info.aserca.gob.mx/claridades/revistas/208/ca208-28.pdf>
- Shen Z, Ruan Y and Chao X. 2015. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression. *Biology and Fertility Soils* 51: 553-562. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1002-7>
- Skinnider MA, Merwin NJ, Johnston CW and Magarvey NA. 2017. PRISM 3: expanded prediction of natural product chemical structures from microbial genomes. *Nucleic Acids Research* 45(W1): W49-W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx320>
- Tian T, Liu Y, Yan H, You Q, Yi X, Du Z, Xu W and Su Z. 2017. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic acids research* 45(W1): W122-W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx382>
- Tlalpal-Bolaños B, González Hernández H, Zavaleta Mejía E, Sánchez García P, Mora Aguilera G, Nava Díaz C, Del Real Laborde JI y Rubio Cortes R. 2014. Colonización de *Trichoderma* y *Bacillus* en plántulas de *Agave tequilana* Weber, var. Azul y el efecto sobre la fisiología de la planta y densidad de *Fusarium*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(1): 62-74. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v32n1/v32n1a6.pdf>
- Trapnell C, Pachter L and Salzberg SL. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25(9): 1105-1111. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>
- Trinidad-Cruz JR, Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, López-Pérez L y Hernández-Cuevas LV. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(2): 151-169. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1607-5>
- Uc-Arguelles AK, Perez-Moreno J, Ayala-Escobar V y Zavaleta-Mejía E. 2017. Antagonismo de *Saccharicola* sp. contra fitopatógenos de la raíz de chile jalapeño (*Capsicum annuum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(2):263-283. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1611-6>
- Valenzuela-Aragon B, Parra-Cota FI, Santoyo G Arellano-Wattenbarger GL and de los Santos-Villalobos S. 2019. 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>
- Valenzuela-Ruiz V, Gálvez-Gamboa GT, Villa-Rodríguez ED, Parra-Cota FI, Santoyo G and de los Santos-Villalobos S. 2020. Lipopeptides produced by biological control agents of the genus *Bacillus*: a review of analytical tools used for their study. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(2): 419-432. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191>
- Valenzuela-Ruiz V, Robles-Montoya R, Parra-Cota FI, Santoyo G, Orozco-Mosqueda, Ma. Del Carmen, Rodríguez-Ramírez R and de los Santos-Villalobos S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech* 9:436. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>
- Van Heel AJ, de Jong A, Song C, Viel JH, Kok J and Kuipers OP. 2018. BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research* 46(W1): W278-W281. <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

- Varghese NJ, Mukherjee S, Ivanova N, Konstantinidis KT, Mavrommatis K, Kyrpides NC and Pati A. 2015. Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Research* 43(14): 6761–6771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv657>
- Vatsa P, Chiltz A, Luini E, Vandelle E, Pugin A and Roblin G. 2011. Cytosolic calcium rises and related events in ergosterol-treated Nicotiana cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(7): 764-773. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.04.002>
- Villa-Rodríguez E, Parra-Cota F, 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>
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI and De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexican Journal of Phytopathology* 36(1): 95-130.
- Vinale F, Manganiello G, Nigro M, Mazzei P, Piccolo A, Pascale A, Ruocco M, Marra R, Lombardi N, Lanzuise S, Varlese R, Cavallo P, Lorito M and Woo SL. 2014. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules* 19(7): 9760-9772. <https://doi.org/10.3390/molecules19079760>
- Weber T, Rausch C, Lopez P, Hoof I, Gaykova V, Huson DH and Wohlleben W. 2009. CLUSEAN: a computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Journal of Biotechnology* 140(1-2): 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.01.007>
- Woo SL, Ruocco M, Vinale F, Nigro M, Marra R, Lombardi N, Pascale A, Lanzuise S, Manganiello G and Lorito M. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycology Journal* 8: 71–126. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Worley B and Powers R. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics* 1(1):92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Wu TD and Nacu S. 2010. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* 26(7): 873-881. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq057>
- Xi W, Gao Y, Cheng Z, Chen C, Han M, Yang P, Xiong G and Ning K. 2019. Using QC-Blind for Quality Control and Contamination Screening of Bacteria DNA Sequencing Data Without Reference Genome. *Frontiers in Microbiology* 10: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01560>
- Xu Y, Chen H, Zhong X and Cai X. 2012. Induction of hypersensitive response and nonhost resistance by a *Cladosporium fulvum* elicitor CfHNNII is dose-dependent and negatively regulated by salicylic acid. *Journal of Integrative Agriculture* 11(10): 1665–1674. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60169-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60169-5)
- Yoon SH, Ha SM, Lim J, Kwon S and Chun J. 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek* 110: 1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>
- Zerbino DR and Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821–829. <https://doi.org/10.1101/gr.074492.107>
- Zhang W, Fraiture M, Kolb D, Löffelhardt B, Desaki Y and Boutrot FF. 2013. *Arabidopsis* receptor-like protein30 and receptor-like kinase suppressor of BIR1-1/EVER-SHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *Plant Cell* 25(10): 4227–4241. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117010>