

Bacterias antagonistas a *Botrytis cinerea* aisladas de flor del manzano

Rocío Crystabel López González¹, Ramón Álvar Martínez Peniche² y Juan Ramiro Pacheco Aguilar³
1 rcl.gonzalez27@gmail.com; 2 alvar@uaq.mx; 3juanramiro29@yahoo.com.mx
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química
México

Resumen

Las enfermedades fúngicas que afectan a los frutos en la etapa poscosecha son una grave amenaza para la comercialización de alimentos. Usualmente, estas enfermedades son controladas mediante la aplicación de antifúngicos químicos; sin embargo, se ha observado un aumento en la resistencia de algunos hongos, como *Botrytis cinerea*, causante de la pudrición gris en uva. Por lo anterior, la implementación de otras medidas, como los microorganismos agentes de biocontrol, constituye una alternativa prometedora. En el presente trabajo, se aislaron y caracterizaron bacterias asociadas a flores de dos variedades de manzano ('Joya' y 'Royal Gala') durante dos años de cultivo, con la finalidad de encontrar poblaciones antagonistas a *Botrytis cinerea*. Los resultados mostraron bacterias del género *Bacillus* asociadas a las flores de ambas variedades de los años 2017 y 2018; en los ensayos antagonistas en fruto de uva, se observó que la bacteria *Bacillus velezensis*, aislada en ambos años presentó la mayor inhibición del crecimiento de *B. cinerea* (>75 %). Al analizar la producción de compuestos antifúngicos de *Bacillus velezensis*, se observó que tiene capacidad hemolítica y de producir sideróforos, lo cual puede estar involucrado en su capacidad antagonista. Estos resultados muestran que los microorganismos asociados a la flor del manzano, contiene poblaciones de bacterias con potencial de biocontrol de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: Pudrición gris, Vid, 16S ribosomal, Ecología microbiana.

Abstract

Fungal diseases that affect fruits in the post-harvest stage are a serious threat to the commercialization of food. Usually these diseases are controlled by the application of chemical antifungals, however, an increase in the resistance of some fungi, such as Botrytis cinerea, causal agent of gray rot in grapes, to these chemical treatments has been observed. Therefore, the implementation of other type of treatments, such as biocontrol agents, is a promising alternative for the control of these diseases. In this work, bacteria associated with flowers of two apple tree varieties ('Joya' and 'Royal Gala') were isolated and characterized during two years of cultivation; in order to find antagonistic populations of Botrytis cinerea, one of the main post-harvest phytopathogens. The results showed bacteria of the genus Bacillus associated with the flowers of both varieties in both years. In the grapefruit antagonist assay, it was observed that Bacillus velezensis, isolated in both years, showed the greatest inhibition of the growth of B. cinerea (> 75%). When analyzing the production of antifungal compounds of Bacillus velezensis, it was observed that it has hemolytic capacity and of producing siderophores, which may be involved in its antagonistic capacity. These results show that the microorganisms associated with the apple blossom contain populations of bacteria with biocontrol potential of phytopathogenic fungi.

Keywords: Gray rot, Grapevine, 16S ribosomal, Microbial ecology.

Artículo arbitrado

Recibido:
08 de septiembre de 2019

Aceptado:
25 de septiembre de 2019

Introducción

Los hongos fitopatógenos se consideran la principal causa de pérdidas de frutas y verduras frescas en los niveles de poscosecha, distribución y consumo. Uno de los principales enfoques para evitar el daño es el control químico, aplicado durante todo el cultivo hasta la cosecha. Sin embargo, las consecuencias del uso de estos fungicidas químicos, como el residuo de éstos en la fruta y el desarrollo de cepas de hongos resistentes, han llevado a la búsqueda de estrategias alternativas seguras y efectivas, como el control biológico basado en microorganismos (Spadaro y Droby, 2016).

Botrytis cinerea es uno de los fitopatógenos que ha presentado un aumento a la resistencia a múltiples fungicidas químicos como Piraclostrobin, Boscalida, Ciprodinil y Fenhexamida, los cuales son diferentes en su mecanismo de acción (Fernández-Ortuño et al., 2017). *B. cinerea* es el agente causal del moho gris, principalmente en las uvas, y por tal es responsable de daños económicos significativos en viñedos en todo el mundo; además, es un problema general en otros frutos como fresa, manzana, pera, kiwi, tomate, durazno y calabaza; así como para algunas hortalizas como brócoli, lechuga y coliflor (Singh y Sharma, 2018). Todo esto hace que *B. cinerea* sea considerado como un fitopatógeno de alto riesgo y uno de los principales blancos para el uso de agentes de biocontrol.

La búsqueda de los microorganismos de biocontrol se ha centrado en el estudio de aquellos que están asociados a las plantas, ya que son constantemente colonizadas por una comunidad muy diversa de microorganismos; por ello, han sido fuente de la mayoría de los agentes de biocontrol contra fitopatógenos. Esto se debe a que, dentro de las interacciones que desarrollan para permanecer y colonizar a la planta, se encuentran la producción de moléculas antimicrobianas como sideróforos y lipopeptidos (Usall, 2016). Actualmente, la hoja es uno de los órganos más utilizado para la obtención de agentes de biocontrol; sin embargo, se conoce que otros órganos, como las flores, cuentan con una amplia diversidad de bacterias y levaduras, de las cuales poco se conoce sobre su potencial antagonista

contra hongos fitopatógenos (Shade, 2013). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar bacterias asociados a la flor en dos variedades de manzano, 'Joya' y 'Royal Gala', durante dos ciclos de cultivo (años 2017 y 2018) en Amealco Qro, con el propósito de conocer la población de bacterias antagonistas de *B. cinerea*.

Metodología

Sitio de muestreo

El muestreo se realizó en una huerta experimental del municipio de Amealco, Querétaro (20°09'LN, 100°07'LO y 2279 msnm) durante el mes de febrero entre 2017 y 2018. De tres árboles de la variedad 'Joya' y 'Royal Gala', se tomó un corimbo de flor de manzano de cada árbol (Figura 1).

Aislamiento, clasificación e identificación de bacterias

Los corimbos se colocaron en bolsas de polietileno estériles a las cuales se agregaron 10 ml de *buffer* para remover los microorganismos epífitos (1 L de agua destilada contiene 6.75 g KH_2PO_4 y 8.75 g K_2HPO_4). Las muestras fueron sonicadas (Branson 5510, 135 W, 42 KHz) durante 5 minutos y agitadas a 600 rpm por 10 minutos. Posteriormente, el *buffer* de lavado obtenido se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos para recuperar la pastilla microbiana. Se adicionó 1 mL de solución salina (0.85 % de NaCl) para resuspender la pastilla (Desgarenes et al., 2014). Se inocularon 100 μL de la solución en placas Petri con agar nutritivo (AN, Dibico, México) adicionado con 50 mg/L del antifúngico Fluconazol (PiSA, Mexico) para limitar el crecimiento de hongos y levaduras, las placas se incubaron a temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) por una semana. Las diferentes colonias observadas se transfirieron a una nueva caja con AN hasta obtener cepas puras. Estas fueron clasificadas en morfotipos con base en la morfología colonial (forma, color, borde y elevación) morfología celular y pruebas bioquímicas (Agar Lisina Hierro, Agar Triple Azúcar Hierro y Citraro de Simons).

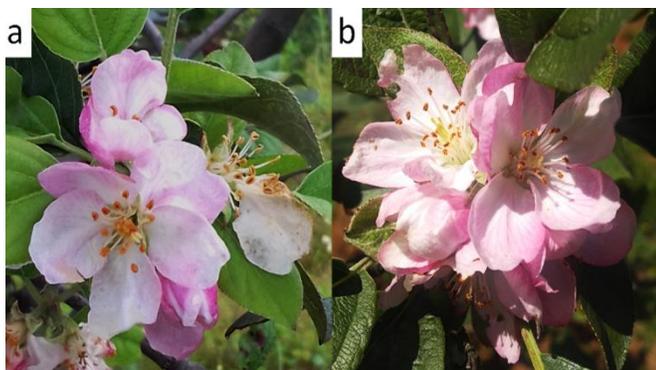


Figura 1. Corimbos de flores de las variedades 'Joya' (a) y 'Royal Gala' (b), colectadas en Amealco, Qro. Fuente: elaboración propia.

De cada morfotipo, se seleccionó una cepa característica para la identificación molecular mediante la amplificación del 16S ribosomal. El ADN se obtuvo mediante el *kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep* (Zymo Research, EUA). El 16S fue amplificado mediante PCR en una reacción de 25 μ L que contenía: 1X REDian™ 2X PCR Master Mix, 5 ng/ μ L de DNA y 10 mM de los cebadores 27F (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') y 1492R (5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3') (Fredriksson et al., 2013). El programa de PCR tuvo una desnaturalización inicial de 6 minutos a 95 °C, 40 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, 30 segundos de alineamiento a 50 °C, 60 segundos de extensión a 72 °C; seguido de una extensión final por 10 minutos a 72 °C. Los amplicones de PCR obtenidos fueron purificados mediante el *kit DNA Clean and Concentrator™* (Zymo Research, EUA) y secuenciados mediante la tecnología Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, México). Las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos de secuencias genéticas *GenBank* (EUA). Todas las cepas identificadas en este estudio están preservadas en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Pruebas de antagonismo contra Botrytis cinerea

Para determinar la actividad antagonista en fruto, se analizó su actividad en uva blanca sin semilla de la variedad *Great Green™*. El inóculo de las bacterias se obtuvo mediante la inoculación de una colonia en

medio Caldo Nutritivo (CN) y se incubó a temperatura ambiente (aproximadamente 28°C) en agitación constante a 400 rpm durante 24 horas. Las esporas para el inóculo de *B. cinerea* cepa 134 se obtuvo del crecimiento del hongo en medio NYDA hasta lograr la esporulación (10 días). Las concentraciones finales a utilizar del hongo fue 1×10^4 esporas/mL y de las bacterias, 1×10^7 células/mL. Los frutos fueron desinfectados mediante lavados consecutivos de 5 minutos en etanol al 90%, 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1 %, 1 minuto en etanol al 70 % y finalmente tres lavado con agua estéril. Posteriormente, se hizo una perforación (5 mm x 3 mm) mediante un sacabocado en la zona ecuatorial de los frutos. 20 μ L de la solución de levadura fueron colocados en la perforación y se dejaron reposar por 30 minutos, consecuentemente se colocaron 20 μ L del hongo. Los frutos se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente (28°C) por una semana. Cada ensayo se realizó por quintuplicado, así como el testigo del hongo sin la presencia de bacteria. La actividad antagonista se expresó como porcentaje de reducción de la lesión en fruto (PRL) en relación con el control positivo. $PRL (\%) = [(D1 - D2) / D1] \times 100$, donde D1 es el diámetro de la lesión de control positivo (*B. cinerea*) y D2 es el diámetro de la lesión producida por la coinoculación de la bacteria y el hongo.

Evaluación de producción de compuestos antifúngicos

Se determinó la capacidad de producir sideróforos y compuestos hemolíticos de las bacterias que mostraron disminuir el daño en fruto por *B. cinerea*. La producción de sideróforos se determinó usando el ensayo *Chrome azuril S (CAS)* (Schwyn y Neilands, 1987). Se inoculó por estriado a partir de un cultivo activo, las bacterias que causaron un cambio de coloración del medio de azul a amarillo después de 3 días de incubación a temperatura ambiente, se consideraron positivos para la producción de sideróforos. La actividad hemolítica se evaluó en placas de agar sangre (MCD LAB, México). Se tomó un inóculo de las cepas de bacterias de un cultivo activo y se estrió en el medio, las placas se incubaron

a 30°C durante tres días. Las bacterias que producían halos traslucidos alrededor del crecimiento de la colonia fueron considerados como positivos para actividad hemolítica.

Análisis estadísticos

Se estimó la abundancia relativa de cada especie de bacteria aislada, del corimbo de flor de cada variedad en estudio, en ambos años. Los porcentajes de inhibición obtenidos en el ensayo de antagonismo se transformaron a grados angulares para su análisis a través de una prueba de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico de R.

Resultados

Identificación y distribución de las bacterias asociadas a la flor del manzano

De las muestras colectadas por año y con base en la caracterización realizada, se lograron clasificar los aislados del año 2017 en 6 morfotipos y en el 2018, se clasificaron 10 morfotipos. Observando un aumento en el número de morfotipos para el segundo año de muestreo. En la población de bacterias del año 2017 se clasificaron en 5 géneros; *Plantibacter*, *Leucobacter*, *Bacillus*, *Psychrobacillus* y *Paenarthrobacter*, de los cuales la especie *Plantibacter flavus* M3 fue la más abundante en las flores de ambas variedades para este año (Fig. 2). Para el 2018, la población de bacterias se clasificó en 9 géneros: *Rahnella*, *Brachybacterium*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus*, *Massilia*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. Se encontró en este año, que a diferencia del año 2017, la bacteria dominante fue diferente en cada variedad, por ello la *Brachybacterium faecium* M3 fue la cepa para la variedad ‘Joya’ y *Staphylococcus saprophyticus* M12 para ‘Royal Gala’. También se observó que el género *Bacillus* fue el único que se encontró constante para ambos años y en ambas variedades; se observó que la bacteria *Bacillus velezensis* fue la única especie encontrada en ambos años, pero menor la abundancia para el año 2018 (Fig. 2).

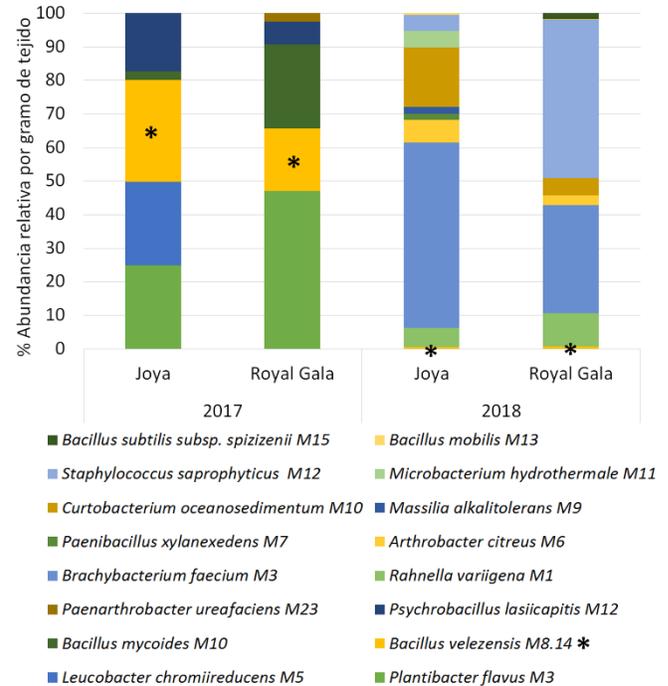


Figura 2. Abundancias relativas de las especies de bacterias asociadas a la flor de la variedad ‘Joya’ y ‘Royal Gala’ en dos años de cultivo. Se señala con asterisco la bacteria *Bacillus velezensis* con mayor actividad antagonista. Fuente: elaboración propia.

Potencial antagonista de bacterias contra *Botrytis cinerea*

Los resultados de las bacterias que mostraron capacidad de disminuir el daño causado por *B. cinerea* 134 en fruto, por arriba del 5 %, se muestran en la Tabla 1 y Figura 3. Se encontró que un 33.3% de los morfotipos bacterianos del año 2017 mostraron tener actividad de disminuir el crecimiento de *B. cinerea* en fruto (Fig. 3, A). En comparación, para el año 2018, fue mayor el porcentaje de morfotipos bacterianos, encontrando que un 90% logró disminuir el daño en fruto.

Para ambos años, la cepa identificada como *Bacillus velezensis* (Fig.2, barras con asterisco), fue la cepa con mayor capacidad de disminuir el daño, dentro de la población de bacterias, por lo que se presentaron valores por arriba del 75% (Tabla 1, Fig. 3, D y E).

Bacteria	Año	Inhibición de crecimiento en fruto (PRL %)
<i>P. flavus</i> M3	2017	9.1±2.6 ^a
<i>B. velezensis</i> M8		75.2±2.3 ^b
<i>R. variigena</i> M1		7.8±4.4 ^a
<i>B. velezensis</i> M14		75.6±2.6 ^b
<i>A. citreus</i> M6	2018	6.3±4.4 ^a
<i>P. xylanexedens</i> M7		15.1±10.7 ^a
<i>C. oceanosedimentum</i> M10		10.1±4.4 ^a
<i>M. hydrothermale</i> M11		12.4±6.0 ^a
<i>S. saprophyticus</i> M12		10.0±5.2 ^a
<i>B. mobilis</i> M13		12.9±8.6 ^a
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> M15		5.1±3.7 ^a

Tabla 1. Actividad antagonista en uva de bacterias aisladas de flor durante dos ciclos de cultivo, contra *B. cinerea* 134. Fuente: elaboración propia.

^{ab} Letras diferentes por columna indican diferencias significativas (Prueba de Tukey-Kramer al 95%).

Al realizar la caracterización de compuestos antifúngicos, como moléculas hemolíticas y sideróforos, se observó que la cepa de *Bacillus velezensis* fue la que mostró mayor producción de compuestos con capacidad hemolítica (Fig. 4, A), los cuales podrían ser de naturaleza lipopéptica. En la evaluación del crecimiento en medio CAS, se observó de igual manera que esta cepa produce sideróforos quelantes del hierro (Fig. 4, B).

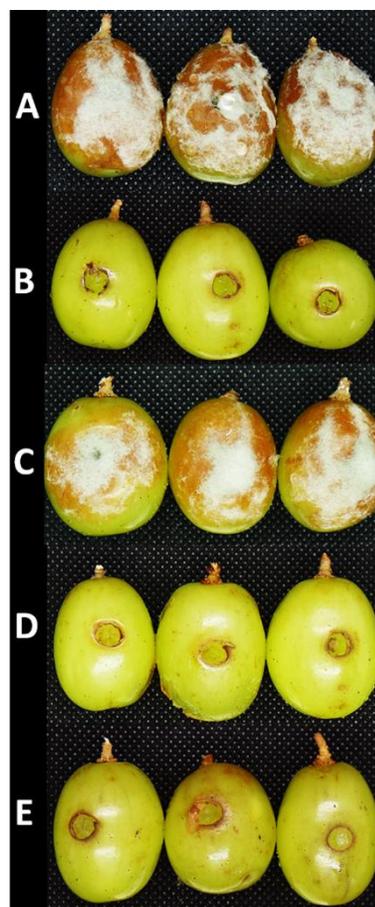


Figura 3. Ensayos de antagonismo en fruto contra *B. cinerea* 134. A) Control Positivo (*B. cinerea* 134); B) Control Negativo (agua); C) *Leucobacter chromiireducens* M5; D) *Bacillus velezensis*, año 2017; E) *Bacillus velezensis*, año 2018. Fuente: elaboración propia.

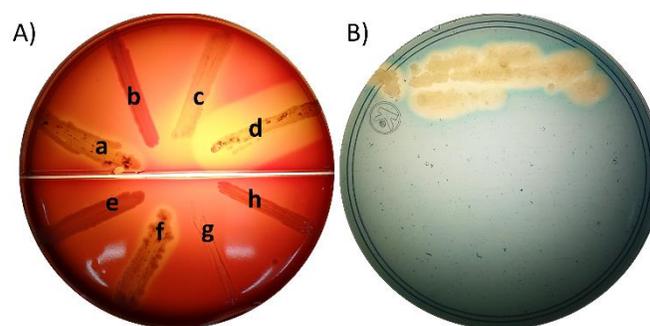


Figura 4. Producción de compuestos con actividad antifúngica evaluados. A) Actividad hemolítica en agar sangre; a: *B. mycoides*; b: *L. chromiireducens*; c: *B. subtilis*; d: *B. velezensis*; e: *P. xylanexedens*; f: *P. flavus*; g: *C. oceanosedimentum* y h: *M. hydrothermale*. B) Formación de halo en medio CAS por sideróforos bacterianos de *B. velezensis*. Fuente: elaboración propia.

Discusión y conclusiones

La comunidad de bacterias cultivables asociadas a las flores de las dos variedades de la manzana (*Malus domestica*) estuvo compuesto de 15 géneros; en la que *Plantibacter flavus* fue la especie dominante en la población del 2017. Hasta el momento, esta especie no ha sido reportada como bacteria presente en flores; lo más cercano que se ha encontrado es la especie *Plantibacter cousinia* en flores de la planta herbácea *Pulmonaria officinalis* (Jacquemyn et al., 2013). En el año 2018, la especie dominante fue diferente en cada variedad de manzano; se encontró que en la variedad 'Joya' fue *Brachybacterium faecium*, al igual que *Plantibacter flavus*, esta especie no ha sido reportada como parte de la población de bacterias en flores; sin embargo, el género de *Brachybacterium* ha sido asociado a flores de tomate, cuyo género es dominante y se mantiene hasta la formación de fruto (Ottesen et al., 2013). En la variedad 'Royal Gala', *Staphylococcus saprophyticus* fue la especie dominante, la cual no ha sido reportada en la microbiología floral u otros órganos de plantas, sin embargo el género de *Staphylococcus* es descrito como parte del microbioma del néctar de flores como la toronja y el almendro (Aizenberg-Gershtein et al., 2013).

Dentro de esta diversidad de géneros bacterianos asociados a las flores del manzano cultivado en Querétaro, el único que se encontró constantemente asociado a este órgano durante los dos ciclos de cultivo fue *Bacillus*. La constante permanencia de este género en comparación a los otros puede deberse a dos posibles razones: en primer lugar, *Bacillus* es también uno de los géneros dominantes y constantes en el suelo (Vasudevan et al., 2015), el cual ha sido reportado como uno de los principales géneros de la comunidad presente en los órganos aéreos de las plantas (Carvalh et al., 2018). En segundo lugar, se ha observado que las cepas de *Bacillus*, una vez presente en la superficie de las plantas, puede colonizar y permanecer asociado de una manera más efectiva que otros géneros de bacterias, debido a la formación de *biofilm* y a su capacidad de producir esporas (Zerriouh et al., 2014).

Debido a esto, el género de *Bacillus* es uno de los que se mostró con mayor asociación con las plantas (Orozco-Mosqueda et al., 2018); sin embargo, no existen muchos reportes sobre la presencia de este género en flores, esto puede deberse principalmente a los pocos trabajos sobre microbiomas en flor. Un ejemplo es el estudio donde se estudió la composición bacteriana de las flores de la planta herbácea *Asphodelus aestivus* (Samuni-Blank et al., 2014), donde se encontraron 16 especies del género *Bacillus*. En flores de manzana de la variedad 'Gala', se encontró que el género *Lactobacillus* fue el más abundante, mientras que no se encontró el *Bacillus*, a diferencia de las variedades del presente estudio.

Las especies de *Bacillus* se han utilizado ampliamente como agentes de control biológico en campos agrícolas debido a su capacidad para limitar el daño por hongos fitopatógenos en las plantas (Sang et al., 2017). Lo cual confirma lo encontrado dentro de la población de bacterias asociadas a las flores del manzano en estudio, ya que se observó que la mayor actividad antagonista contra *B. cinerea*, la obtuvo una cepa de este género, *Bacillus velezensis*, la cual se encontró ambos años. Esta bacteria no ha sido reportada como parte de alguna población bacteriana de flores, pero sí como parte de la población de bacterias de algodón y de la suculenta *Echeveria laui* (Sang et al., 2017). *Bacillus velezensis* ha sido caracterizada como agente de biocontrol para diversos hongos fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum* (Cao et al., 2018). Parte de su capacidad antagonista se ha ligado a la producción de compuestos con capacidad hemolítica como son los lipopéptidos (Adetomiwa et al., 2018), lo cual posiblemente también esté involucrado con la cepa de *Bacillus velezensis* aislada en el presente trabajo de las flores del manzano, ya que dio positivo para la actividad hemolítica. Además de esto último, se observó la producción de sideróforos, los cuales se han identificado en otras cepas de *Bacillus velezensis*, por lo que además de ser utilizada como agente de biocontrol, también se ha probado como bacteria promotora del crecimiento. Por ello, se obtuvieron resultados positivos en plantas como rábano, remolacha, pepino, calabaza y nabo (Melg et al., 2016).

En conclusión, las flores de las variedades de manzano ‘Joya’ y ‘Royal Gala’ están colonizadas por diversas bacterias, las cuales cambian en abundancia y tipo dependiente de la variedad y año de cultivo. Se encontró, dentro de estas poblaciones, bacterias como *Bacillus velezensis* que limitan el daño en fruto ocasionado por *B. cinerea*, uno de los principales hongos fitopatógenos poscosecha. Dentro de los posibles mecanismos involucrados en esta actividad antagonista, se encuentran la producción de moléculas hemolíticas, como lipopeptidos, al igual que quelantes como sideróforos.

Agradecimientos

JRPA agradece por la beca de RCLG proporcionado por CONACYT y al proyecto PROBLEMAS NACIONALES CONACYT PDCPN-2016 “Control Biológico de *Botrytis* sp. mediante levaduras con potencial enológico en Vid” Ref 3930. También agradecemos el apoyo del Dr. Juan Campos Guillén por las facilidades proporcionadas por su laboratorio.

Referencias bibliográficas

Adetomiwa, A., Oluwole, S., Olubukola, B. (2018). Selecting lipopeptide-producing, *Fusarium*-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10.5. *Microbiology Open*, 8, pp. 1-21.

Aizenberg-Gershtein, Y., Izhaki, I., Halpern, M. (2013). Do Honeybees Shape the Bacterial Community Composition in Floral Nectar? *PLoS ONE*, 8, pp. 1-9.

Carvalho, S.D., Castillo, J.A. (2018) Influence of Light on Plant-Phyllosphere Interaction. *Frontiers in Plant Science*, 9, pp. 1-16.

Cao, Y., Hualiang, Pi., Chandransu, Y., Yongtao, Li., Yuqi, Wang., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J., Cai, Y. (2018). Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8, pp. 1-14.

Fernández, D., Pérez, A., Torés, J., De Vicente, D. (2017). Resistencia a múltiples fungicidas en *Botrytis cinerea* en fresa. *Agricola Vergel*, 405, pp. 327-330.

Fredriksson, N., Hermansson, M., Britt-Marie, W. (2013). The Choice of PCR Primers Has Great Impact on Assessments of Bacterial Community Diversity and Dynamics in a Wastewater Treatment Plant. *PLoS ONE*, 8, pp. 1-20.

Jacquemyn, H., Lenaerts, M., Brys, R., Willems, K., Honnay, O. (2013) Among-Population Variation in Microbial Community Structure in the

Floral Nectar of the Bee-Pollinated Forest Herb *Pulmonaria officinalis* L. *PLoS ONE*, 8, pp. 1-12.

Meng, Q., He, J., Jianjun, J. (2016). Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, 98, pp. 18-26.

Ottesen, A. R., Peña, A. G., White, J. R., Pettengill, J. B., Li, C., Allard, S. Rideout, S., Allard, M., Hill, T., Evans, P., Strain, E., Musser, S., Knight, R. and Brown, E. (2013). Baseline survey of the anatomical microbial ecology of an important food plant: *Solanum lycopersicum* (tomato). *BMC Microbiology*. 13, pp. 1-11.

Orozco-, O., Rocha-, M., Glickc, B., Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, 208, pp. 25-

Samuni-Blank, M., Izhaki, I., Laviad, S., Bar-Massada, A., Gerchman, Y. (2014) The Role of Abiotic Environmental Conditions and Herbivory in Shaping Bacterial Community Composition in Floral Nectar, *PLoS ONE* 9, pp. 1-12.

Sang, Y., Sang Y., Hang-Yeon, Weon., Mee, S., Jaekyeong, S. (2017). Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste. *Journal of Biotechnology*, 241, pp. 112-115.

Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, pp. 47-56.

Shade, D., McManus, P., Handelsman, J. (2013). Unexpected Diversity during Community Succession in the Apple Flower Microbiome. *mBio*, 4, 1-12.

Singh, D., Sharma, R. (2018). Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, 1, pp. 1-52.

Spadaro, D., Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, pp.39-49.

Usall, J., Torres, R., Teixido, N. (2016). Biological control of postharvest diseases on fruit: a suitable alternative? *Current Opinion in Food Science*, 11, pp. 51-55.

Vasudevan, G., Siddarthan, V., Ramatchandirane, P.S. (2015). Predominance of *Bacillus* sp. in soil samples of the southern regions of Western Ghats, India. *Annals of Microbiology*, 65, pp. 431-441.

Zerriouh, H., De Vicente, A., Pérez-García, A., Romero, D. (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 16, pp. 2196-2211.