



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD SINALOA**



DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**Secuenciación y análisis funcional de la cepa *B25*
de *Bacillus* sp. antagonista a *Fusarium*
*verticillioides***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

NADIA RUBÍ DOURIET GÁMEZ

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO, 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 19 del mes 06 del año 2018, el que suscribe Nadia Rubí Douriet Gámez alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A140887, adscrito al CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Drs. Carlos Ligne Calderón Vázquez y Claudia Patricia Larralde Corona, y cede los derechos del trabajo titulado “Secuenciación y análisis funcional de la cepa B25 de *Bacillus* sp. antagonista a *Fusarium verticillioides*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones nadia_douriet@hotmail.com; cligne@gmail.com y plarralde@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Nadia Rubí Douriet Gámez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 14 de mayo del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sin. en su sesión Ordinaria No. 05 celebrada el día 03 del mes de mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Douriet
Apellido paterno

Gámez
Apellido materno

Nadia Rubí

Nombre (s)

Con registro:

A	1	4	0	8	8	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Secuenciación y análisis funcional de la cepa B25 de *Bacillus* sp. antagonista a *Fusarium verticillioides*.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Caracterización del genoma de *Bacillus* sp. cepa B25, así como la identificación y análisis de genes expresados diferencialmente en B25 durante su interacción con *Fusarium verticillioides*.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez y Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR-Sin)
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez

Aspirante

Nadia Rubí Douriet Gámez

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Presidente del Colegio

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 10:00 horas del día 18 del mes de junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa

para examinar la tesis titulada:

Secuenciación y análisis funcional de la cepa B25 de Bacillus sp. antagonista a Fusarium verticillioides

Presentada por el alumno:

Nadia Rubí Douriet Gámez
Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno

Con registro:

A	1	4	0	8	8	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dra. Melina López-Méyer

Dr. Héctor M. González Ocampo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Héctor M. Esparza Leal



CIIDIR - IPN
UNIDAD SINALOA
DIRECCION

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez y la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona (CBG-Reynosa). Fue apoyado económicamente por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN (proyectos no. 20170317, 20180446 y 20181778) y por el proyecto Fronteras de la Ciencia (2016-01-2510) titulado “Descifrando los mecanismos de antagonismo que emplea la bacteria *Bacillus cereus sensu lato* cepa B25 para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium verticillioides* causante de pudriciones de raíz, tallo y mazorca de maíz”. La alumna Nadia Rubí Douriet Gámez fue apoyada con becas de CONACyT (230688) y BEIFI-IPN.

DEDICATORIA

Este logro está dedicado a las personas más importantes en mi vida: mi hija Ma. Jimena, mi esposo Gustavo, mis padres Miguel Ángel, Audelia y Ofelia y mis hermanos Delia y Miguel.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis

Dr. Carlos Calderón, por todas sus enseñanzas, paciencia y el gran apoyo para culminar esta etapa que me deja muchas experiencias académicas y personales que no hubieran sido posibles sin su motivación.

Dra. Patricia Larralde, por su colaboración en este trabajo, el gran apoyo en mis estancias y grandes enseñanzas independientemente del área académica.

A mi comité tutorial

Dr. Ignacio Maldonado, Dra. Melina López Méyer y Dr. Héctor Ocampo, por estar siempre dispuestos a brindarme apoyo y compartir sus conocimientos conmigo para mi formación profesional. Dr. Nacho, gracias por todos los momentos en los que sin saber, me ayudó y motivó con sus ocurrencias y por la confianza que me brindó para acercarme a usted en todo momento.

A mis padres

El amor y apoyo incondicional que siempre he recibido de su parte no se alcanza a pagar con nada, pero espero que este logro llene un poco esa deuda eterna que tendré con ustedes, lo amo, siempre.

A mi esposo

Por tu compañía, tu ayuda y apoyo incondicional y ser, junto con nuestra hija, el mejor refugio en momentos difíciles y con quienes compartí las alegrías a lo largo de esta etapa y la mayor motivación para salir adelante y culminar mis estudios, los amo.

A mis compañeros y profesores GENFUN

Mi agradecimiento total a todas las personas que me acompañaron en las distintas etapas de mis estudios de Doctorado, han sido muy importantes, ya que he podido compartir con ustedes todos los buenos momentos y han sido un gran apoyo en los malos ratos. Agradezco infinitamente la amistad tan bonita que ha surgido con algunos de ustedes, muchísimas gracias.

A mis amigas

Tener a personas como ustedes, que se alegren de tus logros y te motiven a salir adelante en los momentos difíciles, es un gran estimulante para echarle ganas en todos los aspectos de la vida. Gracias por su tiempo, su compañía y su apoyo incondicional.

A mis compañeros del programa de DCB

Algunos son amigos entrañables, por ser un gran apoyo, desahogo y motivación para seguir adelante a pesar de las adversidades.

A todo el personal de CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa que de alguna manera me ayudaron y apoyaron durante este tiempo, gracias!

Gracias a **Díos**, por nunca soltarme y mostrarme su presencia en todos los buenos momentos, pero sobre todo en los momentos en los que pensé que no podía seguir.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
ANTECEDENTES	6
JUSTIFICACIÓN	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
CAPÍTULO I: AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE ORIGEN BACTERIANO Y SUS MECANISMOS ANTIFÚNGICOS (Revisión bibliográfica)	12
1.1 Introducción	13
1.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) y sus mecanismos de acción en biocontrol	14
1.3 Genómica y transcriptómica de agentes de control biológico	18
1.4 Características del género <i>Bacillus</i> como agentes de biocontrol	20
1.5 Grupo <i>Bacillus cereus</i>	22
CAPÍTULO II: GENOMIC ANALYSIS OF <i>Bacillus</i> sp. STRAIN B25, A BIOCONTROL AGENT OF MAIZE PATHOGEN <i>Fusarium verticillioides</i>	24
2.1 Abstract	25
2.2 Introduction	26
2.3 Materials and methods	28
2.3.1 Genome sequencing and assembly	28
2.3.2 Genome annotation and identification of genes of interest in B25	28
2.3.3 Phylogenetic analysis	29
2.3.4 Compative genome analysis	30

2.4 Results	31
2.4.1 Genome features of <i>Bacillus</i> sp. <i>B25</i>	31
2.4.2 Phylogenetic analysis	35
2.4.3 Genome properties of <i>Bacillus cereus</i> group	37
2.4.4 Genes involved in antagonism	44
2.5 Discussion	47
2.5.1 <i>B25</i> genome properties and phylogeny	47
2.5.2 Genes associated with fungal antagonism	48
CAPÍTULO III: PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DEL AGENTE DE BIOCONTROL <i>Bacillus</i> sp. CEPA <i>B25</i> EN RESPUESTA A LA INTERACCIÓN CON <i>Fusarium verticillioides</i>	51
3.1 Resumen	52
3.2 Introducción	54
3.3 Materiales y métodos	56
3.3.1 Microorganismos y preparación de inóculos	56
3.3.2 Sistemas de interacción de <i>B25</i> -P03	57
3.3.3 Extracción de RNA total de bacteria y análisis de calidad	60
3.3.4 Preparación de bibliotecas, secuenciación de RNA y análisis de datos de RNA-seq	61
3.3.5 Efecto compuestos bioactivos de <i>Bacillus</i> sp. <i>B25</i> sobre germinación de esporas de <i>Fusarium verticillioides</i> P03	62
3.4 Resultados	63
3.4.1 Efecto de sobrenadantes de <i>B25</i> de bioensayo de interacción sobre germinación de esporas de P03	63
3.4.2 Respuesta genética de <i>Bacillus</i> sp. <i>B25</i> ante la presencia de <i>Fusarium verticillioides</i> P03	65
3.4.3 Adherencia de <i>B25</i> a estructuras celulares de P03	70
3.5 Discusión	71
DISCUSIONES INTEGRADORAS	75
CONCLUSIONES GENERALES	81
ANEXO	82
LITERATURA CITADA	83

RESUMEN

El control biológico es un importante enfoque en el manejo efectivo de las enfermedades de cultivos de interés, y la genómica y transcriptómica son esenciales para el entendimiento de los mecanismos moleculares empleados para el control de enfermedades. *Bacillus* sp. cepa *B25* es un agente de control biológico contra *Fusarium verticillioides* (*Fv*), patógeno del maíz, así como de otros hongos fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue el análisis genómico, transcriptómico y comparativo de *B25* para identificar y estudiar genes asociados con la actividad antifúngica para elucidar los mecanismos de biocontrol en la bacteria. Se secuenció el genoma de *B25*, y las secuencias obtenidas fueron ensambladas. Posteriormente, se realizó una predicción y anotación funcional de genes, obteniéndose un cromosoma de 5,110,703 pb, compuesto por 5,251 genes codificantes para proteínas. Se realizó una búsqueda de genes asociados con mecanismos de biocontrol, identificándose algunos implicados en la producción de enzimas líticas como quitinasas, lipasas, una posible endoglucanasa y una quitosanasa, así como los genes estructurales necesarios para la producción de sideróforos como bacilibactina y petrobactina, el antibiótico surfactina y la producción de biopelículas. Se realizó un análisis de genómica comparativa de *B25*, tanto con cepas asociadas con el grupo *B. cereus*, como con las cepas reportadas como agentes de control biológico del género *Bacillus* *Pseudomonas* y *Serratia*, observándose que los genes asociados con antagonismo se encuentran mayormente conservados entre las cepas filogenéticamente cercanas a *B25* (grupo *Bacillus cereus*). Se llevó a cabo un bioensayo de confrontación entre *B25* y la cepa P03 de *Fv* para realizar un análisis transcriptómico con la intención de identificar genes asociados al antagonismo. En este análisis se encontraron genes involucrados con la producción y actividad de sideróforos, mismos que fueron expresados diferencialmente en etapas tempranas de la interacción con *Fv*, por lo que podrían encontrarse implicados en las primeras respuestas de *B25* ante la presencia del hongo. Los resultados obtenidos demuestran que *B25* posee genes implicados en una amplia variedad de mecanismos para el control de crecimiento de hongos fitopatógenos. Mediante análisis más profundos será posible elucidar

todos los mecanismos génicos que *B25* emplea para controlar hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

Biological control is an important approach in the effective management of crop diseases, and genomic and transcriptomic analysis are essential for the understanding of the molecular mechanisms used for disease control. *Bacillus* sp. strain *B25* is a biocontrol agent of the maize pathogen *Fusarium verticillioides* (*Fv*), as well as other phytopathogenic fungi. The goal of this work was to carry out the genomic, transcriptomic and comparative analysis of *B25* to identify and study genes associated with antifungal activities, in order to elucidate the biocontrol mechanisms used by *B25* strains. *B25* genome was sequenced, and the reads were processed and assembled followed by a gene prediction and functional annotation. A chromosome of 5,110,703 bp was obtained, which was composed of 5,251 protein coding genes. Then, a search and identification of genes associated to biocontrol mechanisms was carried out. Genes involved in lytic enzymes production such as chitinases, lipases, a possible endoglucanase and a chitosanase, as well as the structural genes required for siderophores production such as bacilibactin and petrobactin, the antibiotic surfactin and biofilm formation were identified. A comparative genomic analysis of *B25* was performed by using strains that belong to the *B. cereus* group, as well as those strains reported as biological control agents of the genus *Bacillus* such as *Pseudomonas* and *Serratia*. Genes associated to biocontrol mechanisms were mainly conserved among strains which were close to *B25* (*B. cereus* group) phylogenetically. A confrontation bioassay was set between *B25* strain and the isolate P03 of *Fv* to carry out a transcriptomic analysis for the identification of genes associated to the antagonism response. Differentially expressed genes, which were associated to the production and activity of siderophores in early stages of the interaction of the bacteria to *Fv* were identified, then, they may be involved in the first responses of *B25* to the fungus. The results obtained show that *B25* possesses genes involved in a wide variety of mechanisms to control the phytopathogenic fungi growth. Deeper analysis will make possible the elucidation of all the mechanisms that *B25* uses to control phytopathogenic fungi.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El maíz es un cereal de gran relevancia a nivel mundial debido a una creciente demanda en diferentes ámbitos, principalmente por ser una importante fuente de alimento. México es el cuarto país de mayor producción de maíz en el mundo, siendo Sinaloa uno de los principales estados productores. En el 2016 fue el primer producto agrícola del estado de Sinaloa, sembrándose una superficie de 566,123 ha, con un área cosechada de 554,301 ha, y presentando rendimientos de hasta 11 toneladas por ha, para una producción total de 6,041,464 Ton (SIAP, 2016).

El establecimiento del maíz como monocultivo en Sinaloa en extensiones promedio de medio millón de ha al año en la última década, ha propiciado las condiciones necesarias para que algunas enfermedades se extiendan a grandes superficies del cultivo, entre los patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran algunos hongos del género *Fusarium*, que han ocasionado severos daños en los campos de maíz, afectando directamente a la producción de este cereal (Quintero Benítez y Apodaca Sánchez, 2008).

Actualmente se utilizan diversas estrategias para prevenir o controlar la incidencia de *Fusarium* en los cultivos de maíz, como la rotación de cultivos o el empleo de fungicidas, aunque con poca efectividad. Otra estrategia es el empleo de microorganismos con capacidad de antagonizar a este patógeno presente en el cultivo de maíz, ya que detienen su crecimiento y evitan que afecte a las plantas (Pereira *et al.*, 2010). A este tipo de microorganismos se les ha asignado el nombre de agentes de biocontrol (BCAs).

Los avances científicos respecto al uso de BCAs requieren una comprensión detallada de los principios biológicos de sus mecanismos. Se han analizado una gran cantidad de organismos con potencial antagonista con la ayuda de herramientas moleculares, sin embargo, la interpretación de los datos obtenidos se complica por la falta de información de la secuencia de su genoma (Kubicek *et al.*, 2011). El análisis a nivel de genomas de agentes de biocontrol aporta

información importante sobre los genes que un microorganismo requiere para establecer interacciones, tanto con la planta como con los agentes patógenos, por lo que permite definir los mecanismos implicados en dicho control. En este mismo sentido, el estudio detallado de dichas interacciones, requieren además, de la información generada a partir de análisis transcripcionales, los cuales permiten determinar los mecanismos genéticos que están activamente involucrados en el antagonismo a patógenos para describir un panorama de su regulación.

A pesar de que el aporte de información detallada mediante análisis genómicos y transcriptómicos es importante, son pocos los trabajos reportados en cuanto al estudio de interacciones bacteria-hongo fitopatógeno. Algunos de estos estudios han contribuido a la identificación de mecanismos antifúngicos como producción de antibióticos, enzimas líticas, por mencionar algunos (Puopolo *et al.*, 2017). El estudio del transcriptoma ha contribuido a la identificación específica de genes implicados en la antibiosis de agentes de biocontrol como *Serratia plymuthica* y *Bacillus amyloliquefaciens* y diferentes cepas de *Lysobacter* spp. (Neupane *et al.*, 2014; Zhi *et al.*, 2017).

ANTECEDENTES

En el 2006 se presentó una incidencia devastadora de *Fusarium* en el norte de Sinaloa al observarse pudrición del tallo y raíz y afectaciones en mazorca y grano, síntomas asociados a la infección por este hongo. Inicialmente se sugirió que el agente causal de la fusariosis en Sinaloa era *F. oxysporum*, basado en claves taxonómicas y morfología, después de que la Junta Local de Sanidad Vegetal del Valle del Fuerte (JLSVVF) realizara un monitoreo para determinar al agente causal de estas afectaciones. En su momento, la JLSVVF hizo énfasis en la amplia distribución del patógeno y el inminente agravamiento de la enfermedad ocasionada por este hongo si no se tomaban las medidas de prevención necesarias (Quintero Benítez y Apodaca Sánchez, 2008).

Una sugerencia para el control de *Fusarium* en maíz es la rotación del cultivo de un ciclo agrícola a otro, sin embargo, debido a la alta demanda del maíz, éste no es un método que se tenga en consideración en el estado de Sinaloa. El control químico, como la aplicación de fungicidas en semilla, es una práctica con poca efectividad hacia la problemática debido a que la infección del hongo es endofítica (Pereira *et al.*, 2010). Sin embargo existen alternativas sustentables para controlar las enfermedades ocasionadas por este patógeno que pueden ser aplicadas, aunque aún se encuentran en proceso de estudio para su adecuada utilización.

En el 2009, se identificó molecularmente al hongo responsable de las afectaciones en los cultivos de maíz en Sinaloa, utilizando la región ITS del DNA ribosomal y se determinó que la especie causante de la pudrición de tallo y raíz, y daños en mazorca y grano era *Fusarium verticillioides* (Figuroa-López *et al.*, 2016; Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015). Además, mediante un análisis filogenético basado en diferentes marcadores moleculares, se han identificado tres especies adicionales las asociadas a tejidos sintomáticos de fusariosis del maíz en Sinaloa: *F. andiyazi*, *F. nygamai* y *F. thapsinum*, todas pertenecientes al clado *Fusarium fujikuroi* (Leyva- Madrigal *et al.*, 2014). En paralelo a dicho trabajo, se identificaron agentes bacterianos nativos de Sinaloa que controlan efectivamente a *Fusarium* en maíz (Figuroa-López *et al.*, 2016).

En un esfuerzo por identificar agentes de biocontrol de *Fv* en maíz, el equipo de trabajo de Ecología Molecular de la Rizósfera, creó un banco de germoplasma de microorganismos de la rizósfera de maíz denominado CIIDIR-003 (Cordero-Ramírez, 2013) el cual cuenta con 11,520 aislados de microorganismos pertenecientes a los phyla Firmicutes (80.3%), Proteobacteria (11.8%), Actinobacteria y Bacteroidetes (0.5%). Posteriormente se realizó un escrutinio masivo de estos aislados de la rizósfera sometiéndose a diversos análisis de antagonismo a *Fv*. Los experimentos se realizaron en medio PD (papa-dextrosa) líquido, y se obtuvieron 622 aislados, mientras que en medio PDA (papa-dextrosa-agar), se obtuvieron 42 aislados. La mayoría de los aislados pertenecen al género *Bacillus* y solo algunos pudieron identificarse hasta nivel de especie, tales como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *Paenibacillus polymyxa* con la secuenciación del gen 16S del DNA ribosomal. Una cepa denominada *B25* eidentificada molecularmente como *Bacillis* sp. tuvo un efecto antagónico a *Fv* del 93% en medio líquido y 52% en medio sólido (PDA). Además en ensayos de antagonismo *in planta*, este aislado presentó una reducción de la severidad de la enfermedad ocasionada por el hongo del 53% (Figuroa-López *et al.*, 2016).

Adicionalmente, se observó que esta bacteria posee diversos *mecanismos* de antagonismo a distintas especies de hongos asociadas a la fusariosis tales como la producción de quitinasas, sideróforos, glucanasas y proteasas mediante pruebas bioquímicas y, además, se corroboró que esta bacteria se puede alojar dentro de la raíz de la planta de maíz, por lo que es endofítica (Figuroa-López *et al.*, 2016).

Se ha probado un formulado biológico a base de esta bacteria la cual se ha validado en dos ciclos de cultivo en campo, observándose una reducción en la severidad de la enfermedad ocasionada por *Fv* en diferentes híbridos. Además, se cree que esta bacteria causa una promoción del crecimiento vegetal, debido a los resultados observados en campo, como aumentos en la producción en grano que van de 1 a 2 Ton Ha⁻¹, por lo que se propone que estos resultados se deban a la acción de mecanismos como solubilización de fosfatos y producción de hormonas

vegetales (auxinas) que promuevan el crecimiento radical (Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015).

Con esta información se tienen evidencias bioquímicas y fisiológicas sobre la actividad de la bacteria *B25* en cuanto a mecanismos para antagonizar a *Fv*, sin embargo, no se tiene aún el conocimiento sobre la regulación de dichos mecanismos a nivel genético y es posible que en esta bacteria puedan estar involucrados otros mecanismos aún no identificados.

JUSTIFICACIÓN

El empleo de bacterias como agentes de control biológico de enfermedades de plantas es una alternativa para minimizar de una forma sustentable el uso de pesticidas sintéticos en la agricultura, los cuales se ha observado que causan severos daños al medio ambiente y la salud.

La disponibilidad de plataformas de secuenciación de DNA de alto rendimiento, hace posible un estudio detallado a nivel de genes de los mecanismos involucrados en la interacción de agentes de control biológico, tanto con las plantas, como con los agentes patógenos, lo cual tiene una gran importancia en el área de la agronomía y la investigación.

Se ha identificado al aislado *B25* de *Bacillus* sp., el cual posee un fuerte potencial para ser empleado como agente de biocontrol del hongo fitopatógeno *Fv* y otras especies asociadas a la fusariosis del maíz en Sinaloa. Por lo que es importante estudiar detalladamente los mecanismos que emplea esta bacteria en su actividad antagonista, lo cual es posible a través de las herramientas de secuenciación de DNA, aunado a la utilización de herramientas de biología molecular e ingeniería genética.

HIPÓTESIS

La secuencia genómica de la bacteria *Bacillus* sp. cepa *B25* contiene genes involucrados con producción de compuestos antifúngicos que se regulan a nivel transcripcional al confrontar a *B25* con *Fv*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Elucidar los mecanismos asociados con mecanismos de biocontrol de *Bacillus* sp. cepa *B25* y su regulación genética, empleados para antagonizar al hongo fitopatógeno *Fv*.

Objetivos específicos

1. Caracterizar, analizar y comparar el genoma de *Bacillus* sp. cepa *B25* e identificar genes involucrados con mecanismos de antagonismo a hongos fitopatógenos.
2. Identificar y analizar genes diferencialmente expresados durante la interacción de *Bacillus* sp. cepa *B25* con *Fv*.

CAPÍTULO I

AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE ORIGEN BACTERIANO Y SUS MECANISMOS ANTIFÚNGICOS

Revisión bibliográfica

1.1 Introducción

El control de enfermedades de plantas es una necesidad que ha ido avanzando hasta la actualidad. La demanda en incremento de alimentos vegetales saludables por una población en crecimiento, requiere un mayor control de las enfermedades en los cultivos de interés (Berg, 2009). Los agricultores a menudo se basan en la utilización de pesticidas sintéticos y fungicidas para erradicar o controlar este tipo de problemática y esto ha contribuido de manera significativa a las mejoras en el rendimiento en los últimos años. Sin embargo, la aplicación excesiva y el mal uso de pesticidas y fungicidas han dado lugar a problemas de contaminación hasta pasar directamente en la cadena alimenticia, poniendo en peligro los ecosistemas y la salud pública (Gunnell *et al.*, 2007; Robison *et al.*, 2006). Aunado a esto, muchas veces los elevados costos de los tratamientos químicos no son redituables con respecto a las ganancias de la producción. Es por esto que la investigación científica ha centrado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos métodos que proporcionan un control exitoso sobre enfermedades de plantas, sin ningún efecto negativo para la salud humana y el medio ambiente (Gerhardson, 2002).

En los últimos años, el control biológico ha surgido como una alternativa para el manejo de enfermedades de plantas y de esta manera, minimizar el uso de pesticidas y fungicidas en el campo (Dell' Amico *et al.*, 2005). El término "control biológico" se refiere al uso de organismos microbianos que fungen como antagonistas a determinados patógenos para evitar el desarrollo de enfermedades en plantas de interés, que además, pueden incluso aportar beneficios directos para el crecimiento de las plantas (Cook, 1993). Estos microorganismos son llamados también agentes de biocontrol (BCA, por sus siglas en inglés, biocontrol agents) y su uso no representa un peligro para las comunidades microbianas presentes de manera natural en los cultivos donde son aplicados si se hace de una manera adecuada (Compant *et al.*, 2005 y Lee *et al.*, 2008). De hecho, el desarrollo e innovación de estrategias biológicas en la agricultura como la

promoción del crecimiento vegetal por microorganismos es una contribución importante para hacer del siglo XXI la era de la Biotecnología (Berg, 2009).

1.2 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) y sus mecanismos de acción en biocontrol

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés, plant growth promoting rhizobacteria) se encuentran dentro del grupo de los BCAs asociados a la rizósfera de las plantas, teniendo un efecto directo sobre estas por diversos mecanismos (Figura 1), mismo que pueden ser directos o indirectos. Los mecanismos directos empleados por las PGPR están asociados con la promoción de crecimiento vegetal, la cual se puede llevar a cabo a través del favorecimiento de la disponibilidad de nutrientes, como lo es la solubilización de fosfato inorgánico, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas e inducción de resistencia a patógenos mediante la activación de los sistemas de defensa en la planta huésped (Gray y Smith, 2005; Matilla y Krell, 2018; Mittal *et al.*, 2017).

Los mecanismos indirectos son a través de antagonismo a organismos patógenos (Glick, 1995). Tal actividad antagonista puede ser mediada por distintos mecanismos, incluyendo la competencia con el patógeno por nutrientes o sitios de colonización, la producción de sustancias antibióticas o mediante la producción de enzimas extracelulares para atacar al organismo patógeno (Sturz *et al.*, 2000).

Entre las principales bacterias consideradas como PGPRs se encuentran diversas cepas de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. chlororaphis* y *Serratia marcescens*, entre otras. Algunos de los mecanismos empleados por este tipo de bacterias para el control de organismos fitopatógenos se encuentran indicados en la Tabla 1, según estudios recientes.

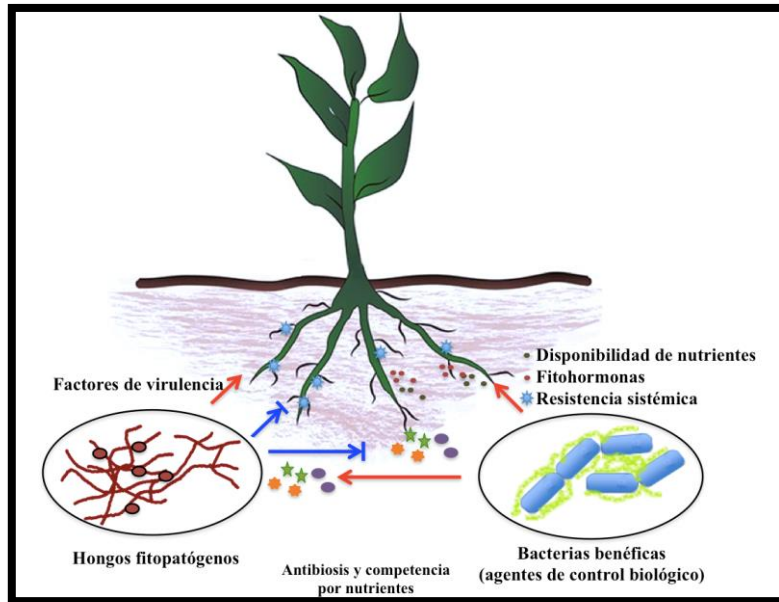


Figura 1. Representación esquemática de la interacción entre plantas, fitopatógenos y agentes de biocontrol en la rizósfera de una planta. Las flechas rojas indican el efecto de un componente de la interacción sobre otro. Las flechas azules indican las barreras biológicas de plantas y bacterias ante el ataque de un hongo fitopatógeno,

Algunas bacterias tienen la capacidad de producir sideróforos para desempeñar la actividad de competencia por nutrientes. Los sideróforos se definen como agentes quelantes de hierro de peso molecular relativamente bajo, secretados por bacterias y también por hongos (Neilands, 1995; Sharma *et al.*, 2018). Específicamente tienen afinidad y especificidad por los iones ferrosos Fe^{3+} , que son convertidos por estos compuestos a Fe^{2+} , para así poder ser asimilados, ya que el hierro es un elemento esencial para la mayoría de los organismos vivos. El hierro tiene importantes papeles en la fisiología celular, como en el transporte, almacenamiento y activación de oxígeno molecular, síntesis de aminoácidos, respiración, biosíntesis de DNA, fijación de nitrógeno y transporte de electrones (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). En un ambiente limitante de hierro en la rizósfera, puede llevarse a cabo una confrontación por este elemento entre una bacteria y un hongo fitopatógeno, en la que la bacteria es capaz de antagonizar al hongo, debido a que éste tiene una menor afinidad hacia el elemento, por lo que la bacteria provoca que el hongo sufra una deficiencia de hierro y no se siga

desarrollando, efectuando así el control biológico (Loper y Henkels, 1999; Sritharan, 2000).

La antibiosis es otro mecanismo empleado por algunas bacterias para el control biológico de enfermedades de plantas, en el que se emplea la producción de sustancias tóxicas llamadas antibióticos, para atacar y suprimir a un organismo patógeno (Islam *et al.*, 2005). Entre las bacterias más reconocidas por emplear la producción de antibióticos para controlar a hongos fitopatógenos se encuentran aquellas asociadas a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, seguido por los géneros *Lysobacter*, *Streptomyces* y *Rhizobium* (Fernando *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013a; Matillaa *et al.*, 2017; Mittal *et al.*, 2017). Entre los antibióticos más comúnmente reportados en estos BCA son 2,4-diacetilfloroglucinol (PhI o DAPG), kanosamina, oligomicina A, oomicina A, ácido phenazina-1-carboxílico, pioluterina, viscosinamida, xanthobacina, zwittermicina A, tensina, tropolona y los llamados lipopéptidos cíclicos (CLP, por sus siglas en inglés, *cyclic lypopeptides*) (Bouizgarne, 2012). Particularmente en el caso de los CLP, estos consisten en macrociclos peptídicos que están acilados con un lípido de ácido graso y muestran una gran diversidad estructural debido a su síntesis no ribosómica casi exclusiva (Kleijn y Martin, 2017). Estos compuestos pueden desempeñar diferentes funciones en el desarrollo y supervivencia, principalmente en cepas de *Bacillus* spp. en su hábitat natural, aumentando la disponibilidad de sustratos hidrofóbicos, metales pesados y formación de biopelículas (Ron y Rosenberg, 2001). Con respecto a su efectividad como agentes de biocontrol de enfermedades de plantas, en la rizósfera existen cuatro principales familias de lipopéptidos en *Bacillus*: bacilomicina, surfactina, iturina y fengicina, que se han estudiado por sus potentes actividades antagónicas contra diversos fitopatógenos (Mora *et al.*, 2015; Ongena y Jacques, 2008). Las iturinas, bacilomicinas y fengicinas tienen una fuerte actividad antifúngica y son inhibitorias del crecimiento de una amplia gama de patógenos de plantas. Las surfactinas por sí solas no son fungitóxicas, pero existen evidencias acerca de un efecto sinérgico con la iturina en esta actividad (Maget-Dana *et al.*, 1992)

Tabla 1. PGPRs utilizadas como agentes de control biológico y los mecanismos empleados contra diferentes organismos fitopatógenos

PGPR	Mecanismo	Patógeno	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<u>Antibióticos</u> Fengicina Iturina Surfactina	<i>Cladosporium cucumerinum</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Pythium aphanidermatum</i>	Cawoy <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<u>Antibióticos</u> Bacilisina Macrolactina Bacillaeno Dificidina <u>Enzimas líticas</u> Proteasas <u>Quitinasas</u> β -Glucanasas	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ben Abdallah <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus cereus</i>	<u>Enzimas líticas</u> Proteasas Quitinasas Pectinasas <u>Metabolitos</u> Cianuro de hidrógeno	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ben Abdallah <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<u>Antibióticos</u> Fenazinas Piocianina 2,4-DAPG <u>Sideróforos</u> Pioverdina <u>Metabolitos</u> Cianuro de hidrógeno	<i>Botrytis cinerea</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Diaporthe phaseolorum</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Hernández- Salmerón <i>et al.</i> , 2016
<i>Serratia marcescens</i>	<u>Antibióticos</u> Prodigiosina <u>Protección y comunicación</u> Formación de biopelículas	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium solani</i>	Matteoli <i>et al.</i> , 2018

Otro de los mecanismos empleados por las bacterias para antagonizar hongos fitopatógenos es la secreción de enzimas líticas, cuya función principal es la liberación o el aumento en la disponibilidad de nutrientes a partir de diferentes sustratos, como la hidrólisis de una gran cantidad de compuestos de hongos, específicamente de su pared celular, como quitina, quitosano, proteínas, celulosa,

glucano, etc. (Chang *et al.*, 2010; Frankowski *et al.*, 2001). Para esto se emplea la secreción de quitinasas, quitosanasas, glucanasas, proteasas, celulasas. Este mecanismo es uno de los principales procesos de micoparasitismo empleado por los BCAs (Massart y Jijakli, 2007). Otro mecanismo importante es la degradación de factores de virulencia del organismo patógeno. Existen bacterias con la capacidad de desintoxicar ciertas áreas infectadas por un patógeno en una planta a través de la producción de proteínas que inactivan ciertas toxinas, disminuyendo o deteniendo el daño en la planta (Zhang y Birch, 1996).

1.3 Genómica y transcriptómica de agentes de control biológico

El reciente progreso en el ámbito de secuenciación masiva de genomas, transcriptomas, proteomas, etc., también llamada *Next generation sequencing* (NGS), abre un abanico de oportunidades para explorar la información genética de cualquier organismo de interés (Neupane, 2013).

Conocer la secuencia del genoma de un organismo brinda gran información acerca del mismo, lo que facilita la localización precisa de un gen o genes, el aislamiento para su caracterización, el estudio de la función coordinada de varios genes para dirigir el crecimiento y mantenimiento de un organismo complejo, así como la identificación de secuencias que regulan la expresión génica (Binnewies *et al.*, 2006). Actualmente, existe una gran cantidad de genomas bacterianos secuenciados, debido a la importancia de conocer a fondo la biología de estos organismos. La tendencia, desde hace ya varios años, es la secuenciación de genomas de BCAs y específicamente de PGPRs de los géneros *Bacillus*, *Serratia* y *Pseudomonas* (Chen *et al.*, 2009; Dunlap *et al.*, 2015; Garbeva *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Roquigny *et al.*, 2015), entre otros.

Gracias a estos análisis se han identificado mecanismos posiblemente implicados en la actividad biocontroladora de los BCAs en cuestión, como se ha reportado en la bacteria *Serratia plymuthica* cepa PRI-2C, la cual exhibe una fuerte actividad antimicrobiana en contra de algunas especies de hongos fitopatógenos como los

grupos de anastomosis de *Rhizoctonia solani* AG3 y AG2, *Verticillium dahliae*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, y *Pythium* spp. Su genoma es de 5.4 millones de pares de bases (Mb) con 4,435 secuencias codificantes, entre las cuales se identificaron genes con actividad de quitinasas, proteasas y biosíntesis de sideróforos, así como un grupo de genes involucrados en la biosíntesis de péptidos no ribosomales antimicrobianos, tales como bacitracina, microcistina y bacilibactina (Garbeva *et al.*, 2012). La bacteria *B. amyloliquefaciens* cepa M27 también es considerada un agente de biocontrol de un amplio espectro de hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma harzianum*, *T. koningii*, y *T. viridescens*. Su genoma de 3.8 Mb y 3,811 genes, contiene varias secuencias codificantes relacionadas con la biosíntesis productos antimicrobianos como la bacilisina; un sideróforo como bacilibactina, policétidos tales como bacillaeno, difucidina y macrolactina, así como lipopéptidos cíclicos como la bacilomicina D, fengicina, iturina y surfactina (Lee *et al.*, 2012). A pesar de la relevancia de PRI-2C y M27 como agentes de biocontrol, por tener en sus genomas información valiosa acerca de su potencial para antagonizar organismos patógenos, estos no han sido detalladamente estudiados, por lo que los mecanismos específicos involucrados en dicho proceso no han sido elucidados.

Si bien la genómica es útil para el análisis global del contenido génico de un BCA para la identificación de todos aquellos posibles mecanismos de antagonismo, la transcriptómica, específicamente la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) de estos organismos, ha sido una valiosa herramienta para conocer la respuesta de un BCA ante un determinado fitopatógeno, para así poder identificar los mecanismos claves implicados en la actividad biocontroladora y su regulación genética. Neupane (2013) estudió el genoma de distintas especies del género *Serratia*, identificando genes involucrados con producción de antibióticos, enzimas líticas y producción de sideróforos, principalmente; pero en un esfuerzo para determinar los genes directamente relacionados con los mecanismos involucrados en el antagonismo al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, realizó también un análisis transcriptómico de las especies *S. proteamaculans* cepa S4 y *Serratia*

plymuthica cepa AS13, observando una sobreexpresión de varios genes que codifican para genes transportadores de sideróforos y genes de defensa de la bacteria en S4, mientras que AS13 mostró una sobreexpresión de genes que codifican para transportadores ABC, genes involucrados en sistemas de secreción de la bacteria, así como la producción de antibióticos como pirrolnitrina. Este podría ser un sistema que se activa conjuntamente para el transporte del antibiótico fuera de la bacteria. Otros estudios, de manera general, destacan aquellos genes implicados en adaptación de las bacterias a un determinado nicho, competencia contra patógenos por nutrientes (Hnnessy *et al.*, 2017), así como una comprensión de la interacción y sincronización de la transcripción génica para un eficiente micoparasitismo y antibiosis (Li *et al.*, 2014; Perazzolli *et al.*, 2016).

La información anteriormente mencionada ha proporcionado importantes avances en la comprensión de la biología, la evolución y la ecología de estos microorganismos, sin embargo, existe una variación en los mecanismos empleados en cada organismo debido a la gran diversidad genética dentro y entre las especies bacterianas, la transferencia horizontal de genes entre los taxones y las variaciones involucradas en diferentes interacciones bacteria-hongo fitopatógeno, mismas que aún no han sido completamente comprendidas (Neupane, 2013).

Debido a las diferencias a nivel genético que existen entre organismos, incluso entre cepas dentro de la misma especie, es importante comprender a fondo la biología e interacciones de cada organismo, en este caso, específicamente de los agentes de biocontrol de interés, ya que existen diferencias en su información genética en la cual puede radicar la importancia de su utilización como método de control de enfermedades en plantas.

1.4 Características del género *Bacillus* como agentes de biocontrol

Los miembros del género *Bacillus* son bacterias Gram-positivas que forman esporas, pertenecientes al filo Firmicutes, con más de 60 especies las cuales

presentan una amplia diversidad genética, la mayoría de estas consideradas no patogénicas (Økstad y Kolstø, 2011).

Los mecanismos de los cuales se vale *Bacillus* spp. para lograr una actividad antagonista contra patógenos de plantas puede implicar la competencia por nutrientes y espacio, antibiosis y micoparasitismo; sin embargo, la estimulación de la resistencia sistémica inducida a enfermedades en plantas es otra forma que *Bacillus* utiliza para controlar los patógenos fúngicos de plantas, principalmente (Narayanasamy, 2013). Los sideróforos son compuestos relacionados con la capacidad de detener el desarrollo de hongos fitopatógenos ampliamente reportados en varias especies del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. cereus* (Dunlap *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2009). *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son conocidos por producir un número considerable de antibióticos, incluyendo los CLPs surfactina, fengicina, iturina A-E, bacilomicina D, F y L principalmente (Baysal *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2016), así como subtilomicina, zwittermicina-A, kanosamina, botricidina, clorotetaína, plipastatina y rhizocitina (Batool *et al.*, 2011; Dunlap *et al.*, 2015; Ji *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2012; Zuber *et al.*, 1993). Algunas cepas de *Bacillus* spp. son capaces de secretar una serie de enzimas hidrolíticas, incluyendo quitinasas, celulasas, lipasas, glucanasas y otras enzimas líticas que también pueden contribuir a biocontrol eficaz (Helistö *et al.*, 2001). Algunos estudios informan la eficacia de *B. cereus* y *B. thuringiensis* para controlar el crecimiento de hongos mediante la inhibición por quitinasas y la secreción de beta-1,4-endoglucanasas (Liu *et al.*, 2011; Martínez-Absalón *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Bacillus sp. produce esporas inactivas que son resistentes a la desecación, al calor, a la radiación UV y a los solventes orgánicos. La capacidad de producir dichas esporas y la amplia gama de mecanismos antimicrobianos, hace que una gran cantidad de cepas de *Bacillus* spp. sean candidatos adecuados para la formulación y comercialización de un biofertilizante o bioplaguicida (Galindo *et al.*, 2013; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016).

1.5 Grupo *Bacillus cereus*

El grupo *Bacillus cereus* comprende seis especies: *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis*. En un principio estos organismos se diferenciaban basándose en características fenotípicas, incluyendo el potencial patogénico (Rasko *et al.*, 2005), sin embargo, la disponibilidad de la información genómica de una gran cantidad de organismos ha permitido diferenciar a unos de otros de acuerdo al tipo de genes que conforman a cada uno (Van der Auwera *et al.*, 2013).

Bacillus cereus, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* son las especies más estrechamente relacionadas entre sí del grupo *Bacillus cereus* (Priest *et al.*, 2004). *Bacillus bombysepticus* es otra especie filogenéticamente muy cercana a este grupo de bacterias (Huang *et al.*, 2009), pero principalmente *B. cereus* y *B. thuringiensis* están involucradas en actividades de control biológico de hongos, sin embargo estas tienen importantes aplicaciones en otras áreas. *Bacillus cereus* es una especie de gran importancia en el área de la medicina ya que es considerada una bacteria patogénica para humanos (Reiter *et al.*, 2011), pero además tiene algunas aplicaciones en la industria como organismo biosurfactante (Xiong *et al.*, 2009) por alojar en su genoma genes involucrados con la producción de sideróforos, sin embargo, se cuenta con antecedentes sobre la función de estos compuestos en actividades de biocontrol. *Bacillus thuringiensis* es ampliamente conocida por su capacidad de producir proteínas insecticidas (Agaisse y Lereclus 1995; Höfte y Whiteley 1989; Sanchis *et al.*, 1999). Se ha encontrado que también produce quitinasas y que éstas facilitan la actividad insecticida (Liu, 2009; Ni *et al.*, 2015), por lo que *B. thuringiensis* puede presentar tanto actividad insecticida, como antifúngica por la secreción de este tipo de compuestos.

Acerca de las características a nivel genómico del grupo *Bacillus cereus*, los miembros del mismo cuentan con genomas cuyo tamaño oscila entre 4 a 6 Mb conteniendo de 4000 a 6000 genes. Estudios donde se han analizado más de 40 cepas de este grupo mostraron que estos comparten un promedio de 1750 genes

(*core-genome*) con otros 2150 genes identificados en casi todos los organismos analizados (*core* extendido) (Zwick *et al.*, 2012). Cada una de las cepas tiene de 400 a 800 genes únicos, que están potencialmente relacionados con los procesos de adaptación a distintos ambientes en cada especie (Lapidus *et al.*, 2008). Estos organismos exhiben genomas complejos y muchas de las cepas contienen una cantidad variable de plásmidos que van de 1 a 12, con tamaños aún más variables que van de 2 a 600 Kb, frecuentemente mayores a 80 Kb (Økstad y Kolstø, 2011).

CAPÍTULO II

GENOMIC ANALYSIS OF *Bacillus* sp. STRAIN B25, A BIOCONTROL AGENT OF MAIZE PATHOGEN *Fusarium verticillioides*

Douriet- Gámez N. R., Maldonado- Mendoza I. E., Ibarra- Laclette E., Jochen
Blom J., Calderón- Vázquez C. L.

Publicado en la revista *Current Microbiology*, vol. 75, pág. 247-255.

DOI 10.1007/s00284-017-1372-1

2.1 ABSTRACT

Bacillus sp. *B25* is an effective biocontrol agent against the maize pathogenic fungus *Fusarium verticillioides* (*Fv*). Previous in vitro assays have shown that *B25* has protease, glucanase, and chitinase activities and siderophores production; however, specific mechanisms by which *B25* controls *Fv* are still unknown. To determine the genetic traits involved in biocontrol, *B25* genome was sequenced and analyzed. *B25* genome is composed of 5,113,413 bp and 5251 coding genes. A multilocus phylogenetic analysis (MLPA) suggests that *B25* is closely related to the *Bacillus cereus* group and a high percentage (70–75%) of the genetic information is conserved between *B25* and related strains, which include most of the genes associated to fungal antagonism. Some of these genes are shared with some biocontrol agents of the *Bacillus* genus and less with *Pseudomonas* and *Serratia* strains. We performed a genomic comparison between *B25* and five *Bacillus* spp., *Pseudomonas* and *Serratia* strains. *B25* contains genes involved in a wide variety of antagonistic mechanisms including chitinases, glycoside hydrolases, siderophores, antibiotics, and biofilm production that could be implicated in root colonization. Also, 24 genomic islands and 3 CRISPR sequences were identified in the *B25* genome. This is the first comparative genome analysis between strains belonging to the *B. cereus* group and biocontrol agents of phytopathogenic fungi. These results are the starting point for further studies on *B25* gene expression during its interaction with *Fv*.

Keywords *Bacillus*, Biocontrol, Sequencing, Comparative genomics

2.2 INTRODUCTION

Several members of the *Bacillus cereus* group, including *B. thuringiensis* and *B. cereus*, are effective in controlling important plant diseases (Reyes-Ramírez *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2014). Given the importance of disease control in agriculture, efforts have been made to clarify the genetic contents of biocontrol agents by genome sequencing of *Bacillus* spp. (Dunlap *et al.*, 2015; Lefort *et al.*, 2014), *Pseudomonas* spp. (Loper *et al.*, 2012) and *Serratia* spp. (Garbeva *et al.*, 2012; Neupane *et al.*, 2012) strains, identifying the genes involved in antifungal activity, including antibiotics, siderophores, lytic enzymes, proteases, non-ribosomal peptides, polyketides, etc. Also, genomic information on biocontrol agents has allowed comparing between related bacteria and bacteria that perform similar functions regarding biological control (Li *et al.*, 2015). For example, a comparative genomics study between *Pseudomonas* spp. strains reported common genes related to antagonism being *P. protegens* Pf-5, the strain with the highest content of biocontrol genes. A significant fraction of these genes were strainspecific. In fact, it has been reported that this group of bacteria only shares 45–52% of all the genetic information (Loper *et al.*, 2012).

The disease control activity exerted by members of the *Bacillus* spp. is complex, with several mechanisms, including competition for nutrients (including iron) and space, antibiosis, mycoparasitism, and biofilm formation (Pal and McSpadden, 2006). To date, the genetic basis of biocontrol mechanisms in members of the *B. cereus* group is not fully understood.

Bacillus sp. B25 is an effective control agent against the phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides* (*Fv*) (Figuroa-López *et al.*, 2016). A decrease in *Fusarium* severity of stalk and ear rot in field trials, as well as fungal fumonisin levels in grain, were observed when this strain was inoculated (Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015). Additional in vitro assays demonstrated that B25 is able to produce protease, glucanase, and chitinase activities, as well as siderophores (Figuroa-López *et al.*, 2016), so it was presumed that this strain owns a wide range of genes reported as related to biocontrol.

B. cereus, *B. thuringiensis*, and *B. anthracis* are the main closely related species belonging to the *B. cereus* group (Priest *et al.*, 2004). Although research on them has been focused on other topics, including human pathology and industrial applications (Reiter *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2009), it is known that the first two species are effective in fungal biocontrol, with the production of chitinases and siderophores as antagonistic mechanisms (Hollensteiner *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2015), or the production of parasporal crystal proteins that can act as insecticide (Höfte and Whiteley, 1989). Thus, strains of this group could possess coding genes for both insecticidal and antifungal activity.

To date, some mechanisms by which *B25* controls *Fv* have been evidenced at the biochemical level; however, its effectiveness against the phytopathogenic fungus both in the field and in vitro experiments, suggests that *B25* owns a wider range of mechanisms that makes it an interesting biocontrol agent. Genomic information of *B25* could be shared with phylogenetically related strains and other biocontrol agents. Hence, a comprehensive knowledge of gene content of *B25* would elucidate the genetic basis involved in controlling fungal activities. A genomic comparison of *B25* against related species with similar functional characteristics would elucidate the shared and unique genetic components in *B25*. Here, we analyze the genome of the *B25* strain and describe a genomic comparison of *B25* against five *Bacillus* spp. strains, *Pseudomonas protegens* pf-5, and *Serratia plymuthica* AS9, some of them with biocontrol activities. This is the first comprehensive comparative genome analysis addressed at their genetic potential to control fungal pathogens among strains belonging to this taxonomic group and other biocontrol agents.

2.3 MATERIAL AND METHODS

2.3.1 Genome sequencing and assembly

Genomic DNA isolation was achieved with the DNeasy Blood & Tissue[®] kit (Qiagen, CA, USA). Libraries of 550 and 1000 base pairs were prepared and sequenced in a 2 × 300 format (MiSeq platform, Illumina, San Diego, CA, USA). Adapter trimming and paired-end filtering (with a quality of ≥25) were performed using SeqPrep (St John, 2016). Reads were assembled de novo using Newbler 3.0 (Margulies *et al.*, 2005), and SSPACE (Boetzer *et al.*, 2011) was used to reduce the number of scaffolds, and gaps were closed with GapFiller (Boetzer and Pirovano, 2012). To define if resulting scaffolds were part of a bacterial chromosome, they were compared to *B. thuringiensis* strain BMB171 (CP001903.1). The SynMap tool of the CoGe database (Lyons and Freeling, 2008) was used for aligning and orienting the scaffolds using the genome of BMB171 (He *et al.*, 2010) as reference (Figure S1). The B25 sequence was deposited in the GenBank (CP016285) as *Bacillus* sp. B25 (2016b).

2.3.2 Genome Annotation and Identification of Genes of Interest in B25

Protein-coding sequences and RNA genes were predicted by Glimmer V.3.0 (Edgar, 2004). Automatic assignment of functionality was carried out by the Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) server (Aziz *et al.*, 2008) using BMB171 genome as reference. Selection of antagonistic and housekeeping genes for phylogenetic analysis was carried out browsing the genome with the SEED-Viewer tool of the RAST server. Non-ribosomal peptide synthesis clusters were identified with antiSMASH (Medema *et al.*, 2011), and their function was deduced according to their homology to the known antibiotics using NCBI's conserved domain database (Marchler-Bauer *et al.*, 2017). Genomic islands (GIs) were identified using IslandPath-DIMOB in IslandViewer 4 platform (Bertelli *et al.*, 2017). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) domains were screened using CRISPR finder (Grissa *et al.*, 2007).

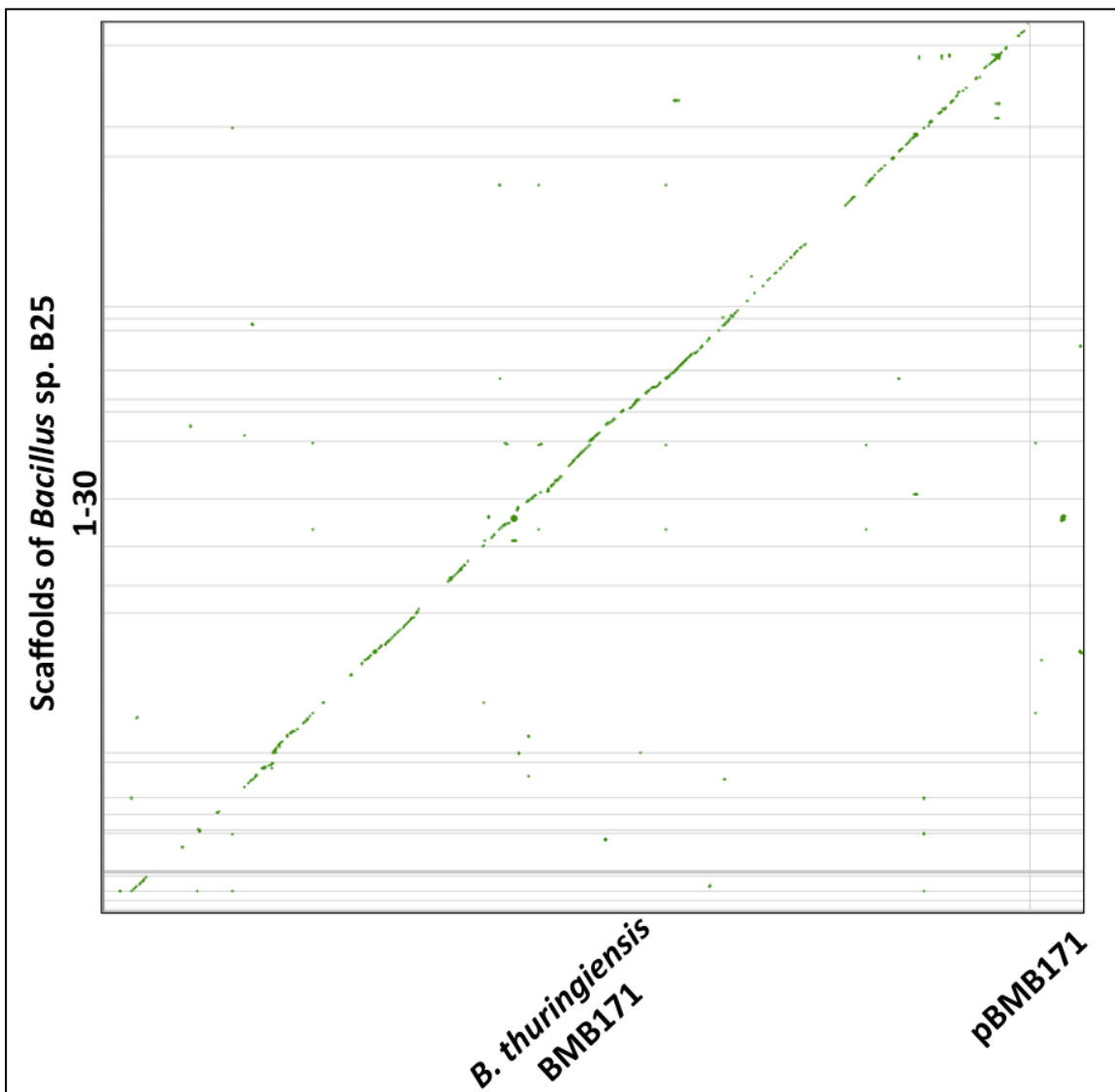


Figure S1. Syntenic dotplot between the genomes of *Bacillus* sp. B25 (y-axis) and *B. thuringiensis* BMB171 (x-axis) laid on each axis. Plots are generated by comparing every CDS between genomes using blastn in order to identify putatively homologous gene pairs.

2.3.3 Phylogenetic Analysis

A multilocus phylogenetic analysis (MLPA) was carried out using a 15 kilobase pair (kbp) concatenated sequence including *16S rRNA*, *gyrB*, *groEL*, *polC*, *rpoB*, and *purH* genes. Gene sequences of B25 were compared with the corresponding

concatenated sequences of ten strains of the *B. cereus* group: *B. cereus* strains ATCC 14579 (CP001903.1) (Höfte and Whiteley 1989), FORC 005 (CP009686.1) (Lee *et al.*, 2015), B4264 (CP001176.1), and Q1 (CP000227.1) (Xiong *et al.*, 2009); *B. thuringiensis* strains BMB171 (Guo *et al.*, 2014), HD-29 (CP010089.1) (Zhu *et al.*, 2015), HD73 (CP004069.1) (Liu *et al.*, 2013a), Bt407 (CP003889.1), and CT-43 (CP001907.1), and *B. anthracis* BA1015 (CP009544.1) (Sheppard *et al.*, 2013). A genome sequence from *B. bombysepticus* Wang (CP007512.1) (Cheng *et al.*, 2014) closely related to this group was also included. Sequences of *B. subtilis* strains 168 (AL009126.3) (Kunst *et al.*, 1997), BAB-1 (CP004405.1) (Guo *et al.*, 2014), *B. amyloliquefaciens* strains M27 (AMPK01000000.1) (Lee *et al.*, 2012), and FZB42 (CP000560.1) (Chen *et al.*, 2009) were used as outgroups. Concatenated sequences were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004) and MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) was used to generate the phylogenetic analysis using the neighbor-joining (NJ) method (Saitou y Nei, 1987) and Kimura 2-parameter model for the phylogenetic tree construction (bootstrap of 1500 replicates). MLPA was supported by means of an average nucleotide identity (ANI) calculation using *B25* sequences against the 11 strains related to *Bacillus cereus* group, using the 15 kbp concatenated sequence and also the complete genome sequence of compared strains. Both analyses were carried out using the ANI calculator (Rodriguez-R. and Konstantinidis, 2016) with the cut-off value to delimit bacterial species set to 95% (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015).

2.3.4 Comparative Genomic Analysis

To determine conserved sequence segments between *B25* in *Bacillus cereus* group, a whole genome alignment was carried out using MAUVE (Darling *et al.*, 2010). To compare the genetic content of *B25* against genetically related strains (*B. bombysepticus* Wang, *B. thuringiensis* BMB17, and *B. cereus* Q1), at the structural and functional levels, a functional gene annotation with the subsystem feature category-based comparison of the RAST server was performed. Shared and unique genes between *B25* and *B. cereus* group were identified using EDGAR (Blom *et al.*, 2009); the pan-genome and core-genome were obtained. A

comparative analysis addressed at identifying genes involved in bacterial antagonism was performed using the proteomes of *Bacillus* sp. B25, *B. bombysepticus* Wang, *B. thuringiensis* BMB171, *B. cereus* Q1, *B. subtilis* BAB-1, *B. amyloliquefaciens* M27, *Serratia plymuthica* AS9 (CP002773.1), and *Pseudomonas protegens* Pf-5 (CP000076.1). The complete dataset contained 33,353 protein-coding genes. An all-against-all comparison was performed using BLAST-P (E-value 1×10^{-10}) followed by clustering with OrthoMCL v1.4 (Li *et al.*, 2003) using a default MCL inflation parameter of 1.5.

2.4 RESULTS

2.4.1 Genome Features of *Bacillus* sp. B25

The *Bacillus* sp. B25 genome contains a circular chromosome of 5,113,413 bp with a GC-content of 35.6%. It comprises 5360 genes, 5251 are coding sequences (CDS), and 109 are non-coding RNAs (Table 1 and Figure S2). 2334 CDS (45%) were classified into 27 functional categories and 470 subsystems (Figure S3) and a putative function was assigned to 2214 CDS (Figure S3, Dataset S1-Anexo). Besides, 18 scaffolds were not aligned with the reference genome and 17 of those showed identity to *Bacillus* spp. plasmids and contained 1063 CDS (Table S1). These contained 22 genes associated with sporulation, 26 genes related to transcriptional regulators, multidrug resistance, and genes related to fungal antagonism such as siderophores and 1 chitinase. Three CRISPR domains were identified in the non-assembled scaffold ppB25_2 along a 8 kbp region that contains the *Cas3*, *Cas5d*, *Csd1*, and *Cas7* genes (Figure S7). According to CRISPR finder, other “questionable” CRISPR sequences were identified in the B25, Wang, BMB171, and Q1 chromosomes. Furthermore, no Cas proteins were identified close to these repeats.

Table 1. *Bacillus* sp. *B25* genome assembly and annotation statistics

Feature	Value
Genome assembly	
Size	5,113,413 bp
GC-content	35.6%
Scaffolds	30
Larger scaffold	863 kbp
Average scaffold size	170 kbp
Number of Gaps	42
Genome annotation	
Total number of genes	5,360
Number of coding sequence (CDS)	5 251
Number of RNA genes	109
Extra chromosomal sequences (not assembled)	18

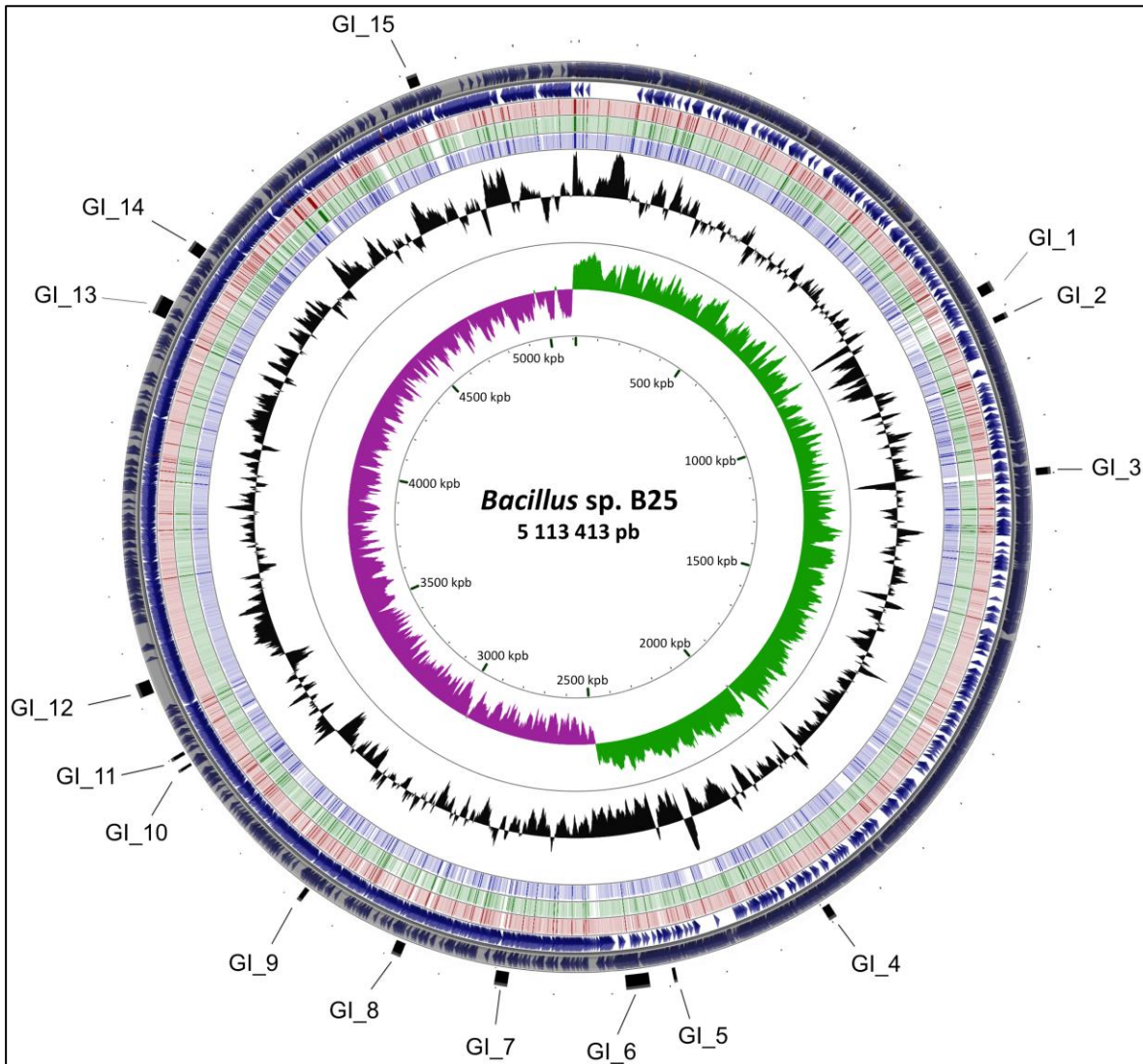


Figure S2. Circular map representing genomic features of *Bacillus sp. B25*. Circles from the outside to the center display: (1) Sites of genome plasticity. (2) *B25* CDS on forward strand. (3) *B25* CDS on reverse strand (tRNA and rRNA genes are indicated in red and pink on circles 2 and 3). (4, 5, 6) Blast comparison of *B. bombysepticus* Wang, *B. thuringiensis* BMB171 and *B. cereus* Q1, respectively. (7) GC percent deviation. content, (8) GC skew.

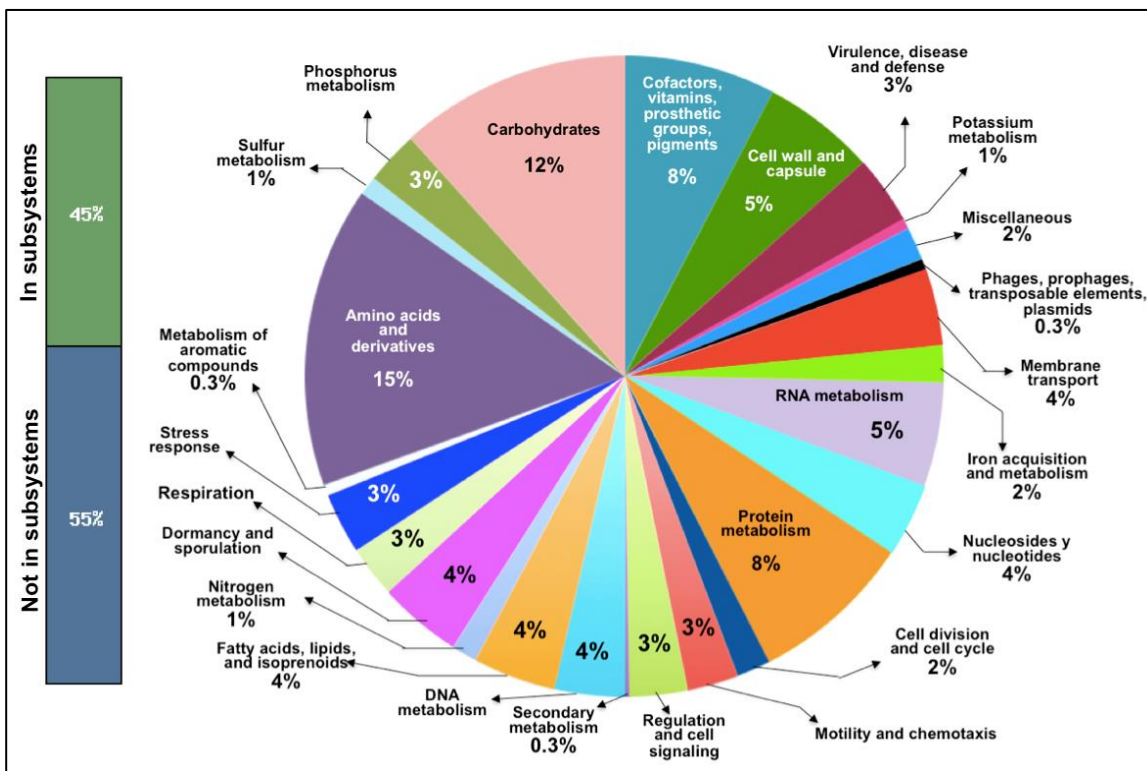


Figure S3. Subsystems categories distribution of *Bacillus sp. B25* based on the RAST annotation server. The green bar of the subsystem coverage indicates the percentage of the CDS included in the subsystems while the blue bar refers to the percentage of the CDS that are not included in the subsystems.

Table S1. Features of the *Bacillus* sp. *B25* non-assembled scaffolds

Features	Lenght (bp)	GC content (%)	No. of CDS	No. of RNA genes
ppB25_1	179,470	31.7	197	1
ppB25_2	175,425	33.0	187	-
ppB25_3	100,377	31.7	108	-
ppB25_4	92,820	32.3	51	-
ppB25_5	73,030	32.4	76	-
ppB25_6	59,835	33.8	78	-
ppB25_7	53,908	35.8	90	-
ppB25_8	51,963	32.0	80	-
ppB25_9	41,105	31.2	61	-
ppB25_10	24,795	31.6	20	-
ppB25_11	21,108	33.0	25	-
ppB25_12	19,745	29.4	24	-
ppB25_13	16,273	34.2	33	-
ppB25_14	9,982	39.3	8	-
ppB25_15	9,022	30.5	14	-
ppB25_16	3,048	33.6	7	-
ppB25_17	2,781	37.1	4	-
Total	934,687	33.1	1,063	1

2.4.2 Phylogenetic Analysis

The *B25* strain was previously identified as *Bacillus cereus sensu lato* (Figuerola-López *et al.*, 2016) based only on the 16S rRNA gene sequence. Here an MLPA was performed and clustered *B25* close to *B. thuringiensis* (BMB171, HD-29, and HD73), *B. cereus* (ATCC 14579, FORC 005, B4264) all related to the *Bacillus cereus* group, and *B. bombysepticus* Wang (Figure S4). This was also confirmed with ANI values obtained using both whole genome and concatenated sequences analysis (Table S2).

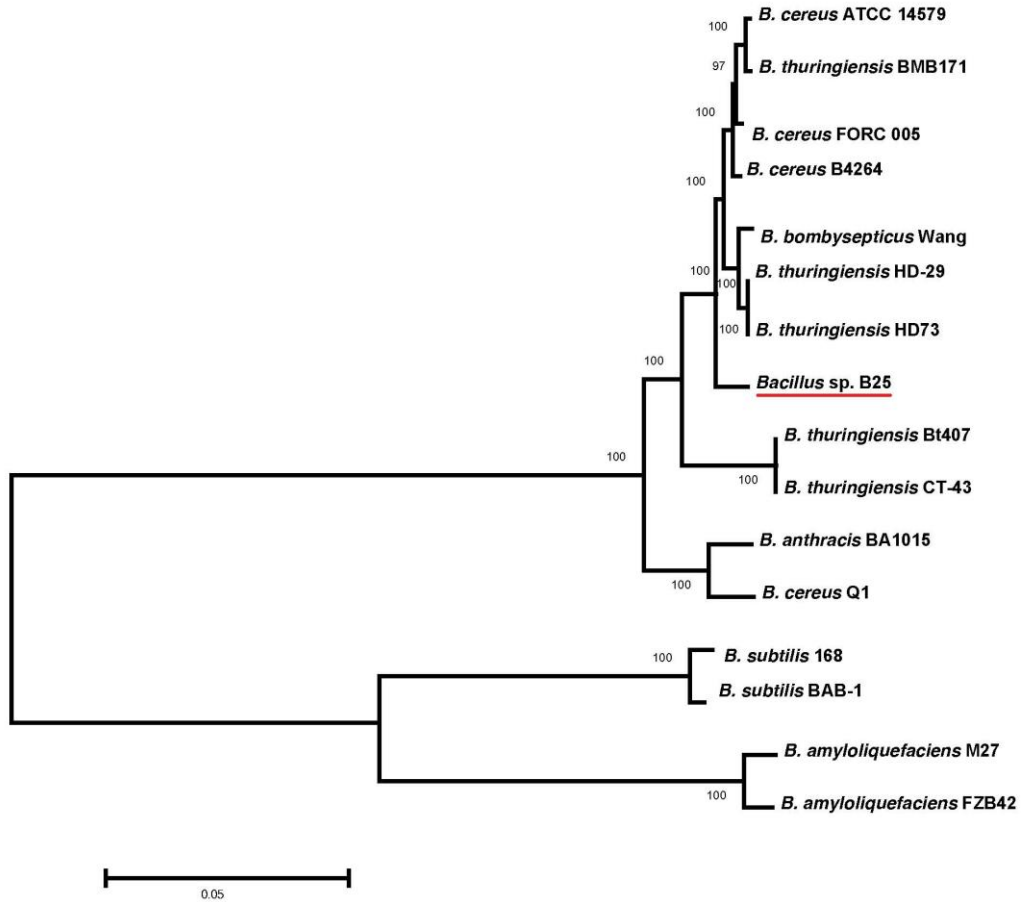


Figure S4. Multilocus phylogenetic analysis of *B25* and *Bacillus cereus* group related strains. Analysis was carried out using a concatenation of 16S *rRNA*, *groEL*, *gyrB*, *polC*, *purH* and *rpoB*. The tree was reconstructed from Kimura 2-parameter using the NJ method; numbers at nodes represent bootstrap percentages based on 1500 replicates; *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* species was used as an outgroup and *B25* position is indicated by a red underline.

Table S2. ANI values obtained when comparing *Bacillus* sp. *B25* against 11 strains belonging to the *B. cereus* group.

Strain	ANI values	
	Concatenated*	WG*
<i>B. cereus</i> B4264	98.58	96.49
<i>B. cereus</i> FORC 005	98.47	96.56
<i>B. bombysepticus</i> Wang	98.42	96.67
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	98.37	96.4
<i>B. thuringiensis</i> BMB171	98.35	96.41
<i>B. thuringiensis</i> HD73	98.32	96.61
<i>B. thuringiensis</i> HD-29	98.31	96.65
<i>B. thuringiensis</i> Bt407	96.06	95.75
<i>B. thuringiensis</i> CT-43	96.06	95.74
<i>B. cereus</i> Q1	94.93	91.10
<i>B. anthracis</i> BA1015	94.95	91.10

WG: Whole genome

*Values are presented in percentage (%)

2.4.3 Genome Properties of the *Bacillus cereus* Group

The genome size and number of predicted genes of *B25* is slightly lower but similar to BMB171, Q1, and Wang and all strains have similar GC-content percentage (35–36% GC) (Table S3). All compared strains have a large proportion of CDS (9.8–10.5%) related to responses against phytopathogens including the subsystems carbohydrates, virulence, disease and defense, stress response, regulation and cell signaling, iron acquisition and metabolism, as well as dormancy and sporulation (Figure S5 Dataset S2-Anexo).

Table S3. Summary of genome features of strains related to *Bacillus cereus* group.

Organism	<i>Bacillus</i> sp. B25	<i>B. bombysepticus</i> Wang	<i>B. thuringiensis</i> BMB171	<i>B. cereus</i> Q1
Importance	Antifungal organism	Insecticidal bacteria	Insecticidal bacteria	Biosurfactant
Genome Size (Mb)	5.11	5.86	5.33	5.21
No. of extra-chromosomal sequences	18 ^a (5 kbp and 2.7-179 Kbp)	1 ^b (578 kbp)	1 ^b (313 kbp)	2 ^b (239 and 53 kbp)
%GC content	35.6	35.3	35.3	35.6
No. of genes	5,360	5,862	5,752	5,666
No. of CDS	5,251	5,592	5,491	5,344
No. of RNA genes	109	133	144	133

^aCorresponds to not assembled sequences in *B25* chromosome, one related to a bacteriophage and 17 to a plasmid sequence

^bExtrachromosomal sequences reported as plasmids by experimental evidence (Cheng *et al.*, 2014; He *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2009)

Pan- and core-genome analysis (Figure 1; Dataset S3-Anexo) revealed that the four strains shared 3964 CDS, corresponding to approximately 70–75% of all CDS in these genomes. Genes that code for virulence factors and those involved with antifungal activity are allocated here. A total of 387 CDS integrate the list of single genes in *B25*, including transporter genes, mobile elements, phages, transcriptional regulators, membrane proteins, motility, and lytic enzymes. Interestingly, two chitinases and one chitin-binding protein were specific for *B25* (Dataset S3-Anexo).

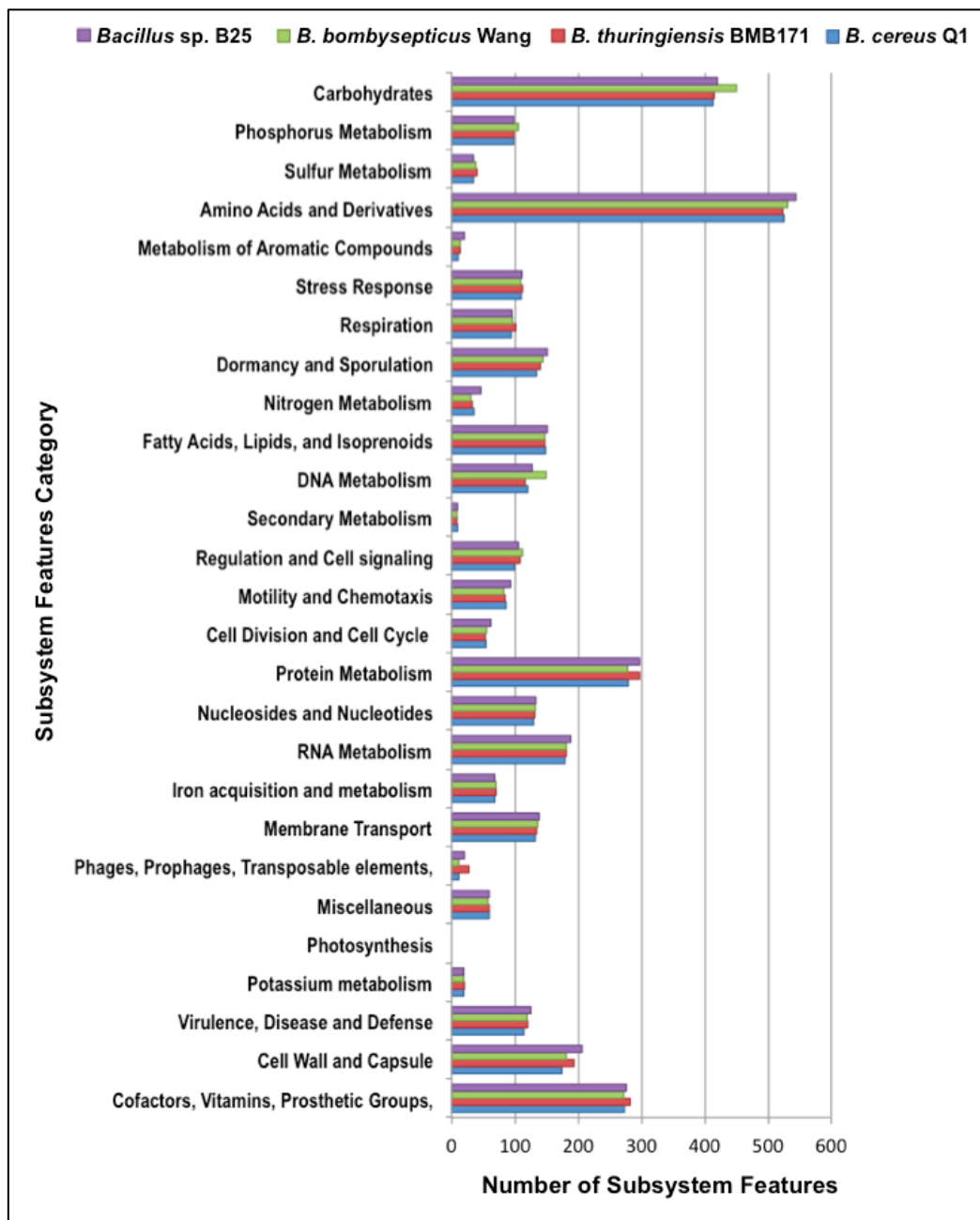


Figure S5. Comparison of subsystem features between genomes of strains related to *Bacillus cereus* group. Functional roles of CDS of the genome of *B. bombysepticus* Wang, *B. cereus* Q1, *B. thuringiensis* BMB171 and *Bacillus* sp. 25 assigned and grouped in subsystem features by RAST. Colored bars indicate the number of genes assigned to each category in each genome.

All compared chromosomes presented high collinearity among their sequences (Figure S6). Q1 was the strain with more translocations in its genome sequence. 15 GIs were identified in the *B25* chromosome (Figure S2) and only 7 GIs were

well conserved along the Wang, BMB171, and Q1 chromosomes (Table S4). These GI regions include genes related to mobile element proteins, phages, transcription/ translation factors, sporulation, multidrug resistance, and lytic enzymes (chitinase and chitosanase). Also 11 GIs are distributed in 8 of the 17 sequences similar to plasmids (Table S5).

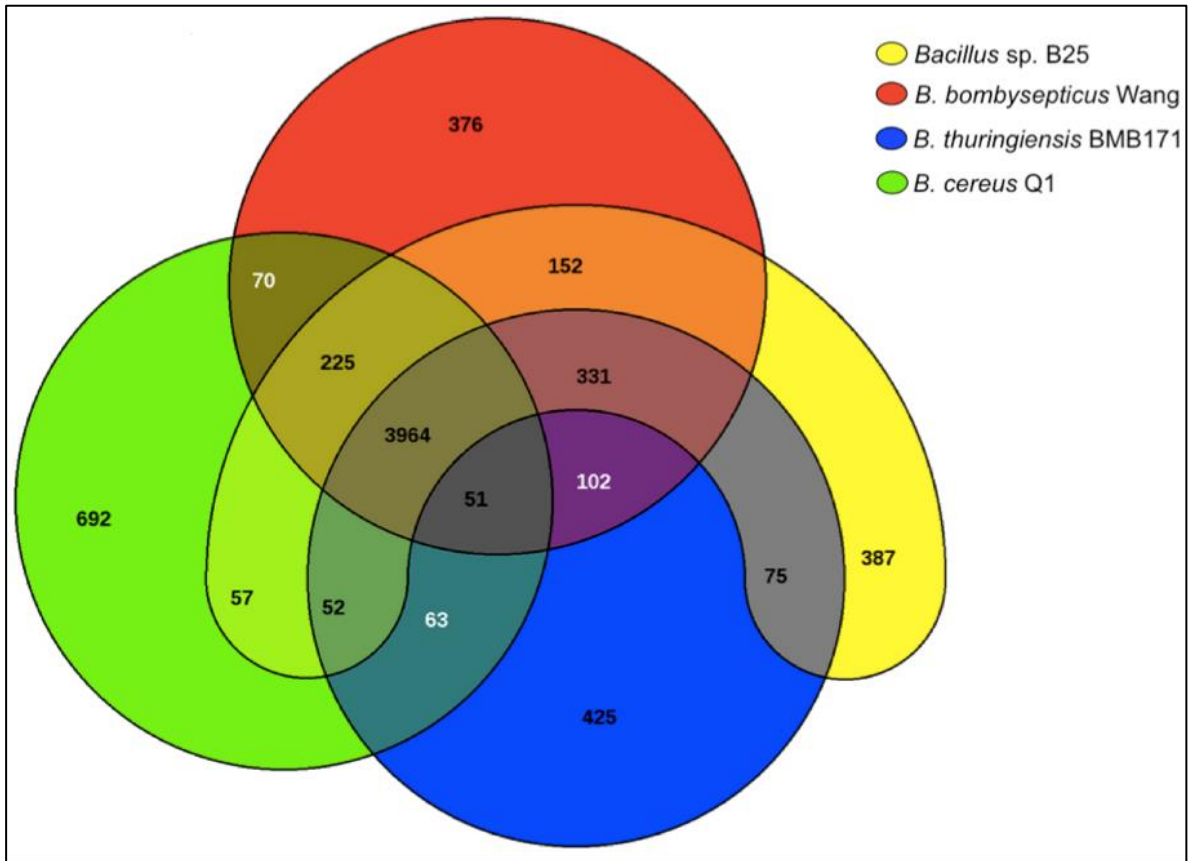


Figure 1. Number of shared and genome-specific genes of strains related to *Bacillus cereus* group. The Venn diagram shows all CDS of *Bacillus* sp. B25, *B. bombysepticus* Wang, *B. thuringiensis* BMB171, and *B. cereus* Q1. Numbers of overlapped regions represent the CDS shared between the genomes compared. The number that is not in an overlapped region indicates the number of CDS in each genome with- out homologs in other genome included in the analysis.

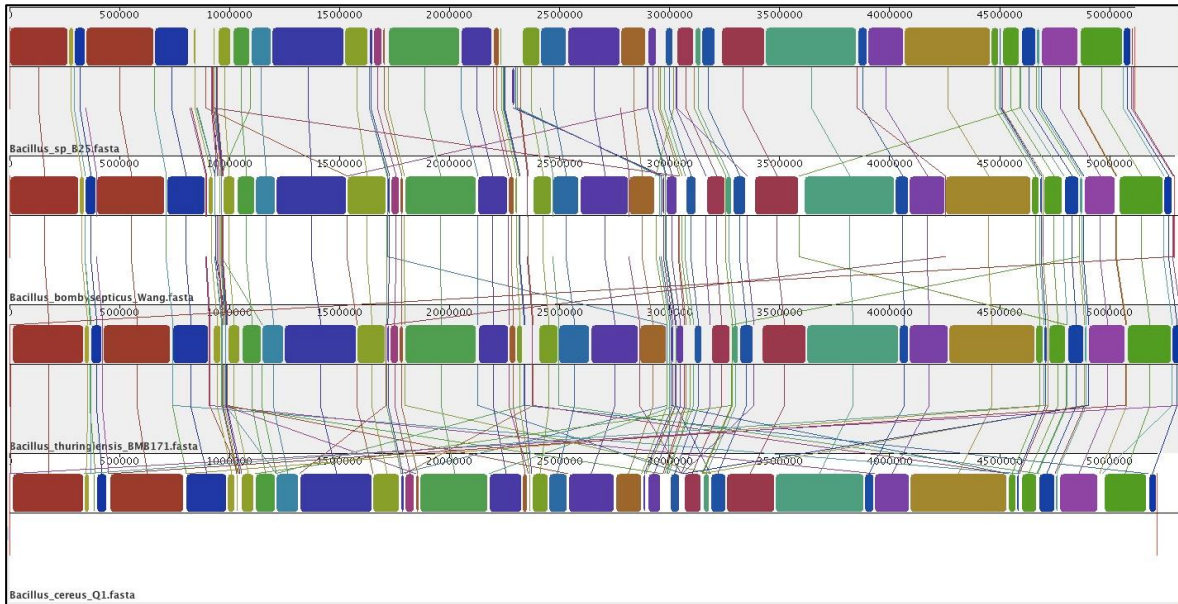


Figure S6 Global genome alignment of strains related to *Bacillus cereus* group. MAUVE alignment of *Bacillus* sp. B25, *B. bombysepticus* Wang, *B. thuringiensis* BMB171 and *B. cereus* Q1 genomes shows the highly conserved between the chromosomes by the same color boxes representing homologous regions without rearrangement (locally collinear blocks or LCB).

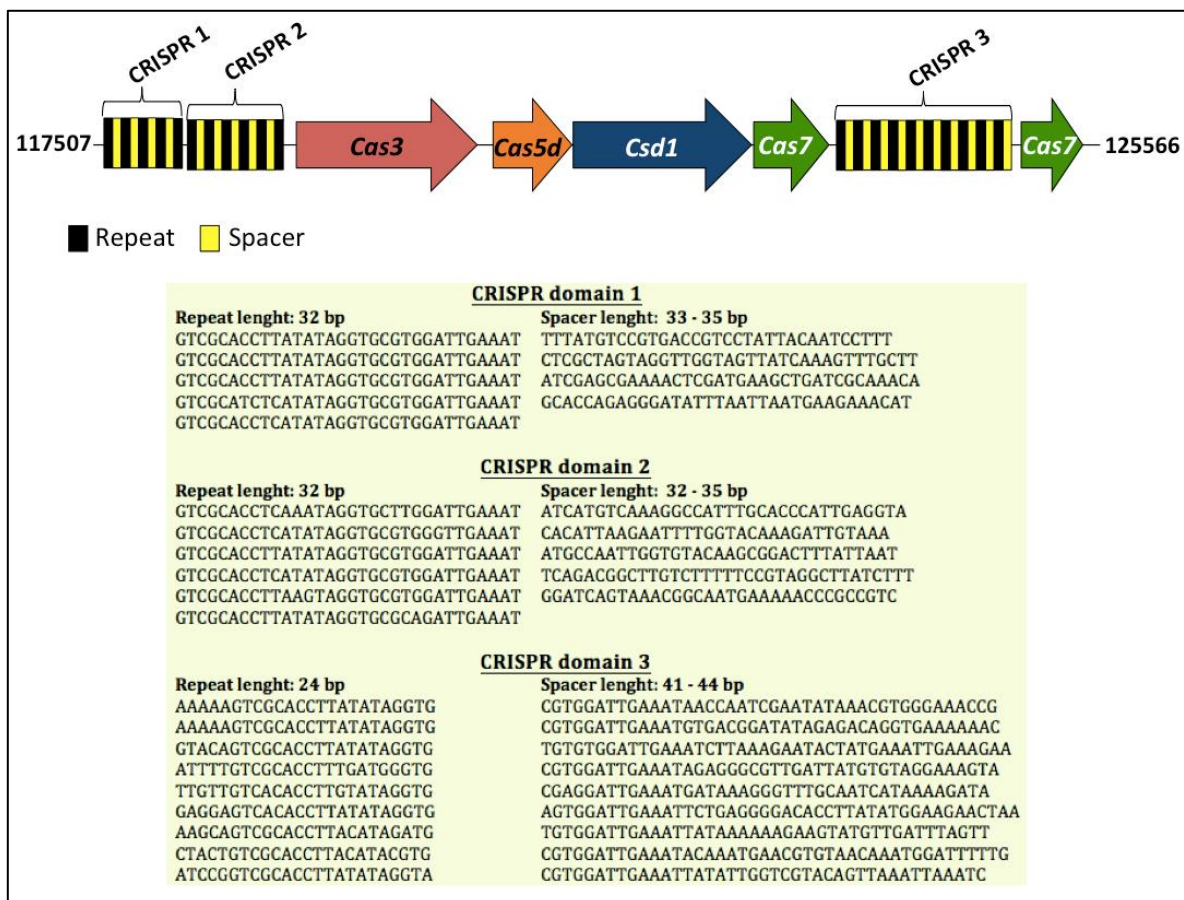


Figure S7 CRISPR system identified in *Bacillus* sp. *B25* scaffold ppB25_2. The figure above shows the arrangement of CRISPR locus (115507 – 125566 bp) composed by repeat sequences (black) and spacer sequences (yellow) as well as their associated genes (*cas*) represented by colored arrows. The box below indicates the respective sequence for each repeat and spacer by CRISPR domain identified.

Table S4. Genomic islands and their features identified in *Bacillus* sp. *B25* genome

Bacillus* sp. B25 GIs present (+) or absent (-) along the genomes *B. bombysepticus* Wang (W**), *B.*

Label	Start	End	Length	Key features	Number of CDS	Conserved* in genome		
						W	B	Q
GI_1	851052	87005	19033	Phage related proteins, cold shock protein, lytic enzymes, transcriptional regulators	30	-	-	-
GI_2	911264	921939	10675	Penicilin binding protein, mobile element, transcriptional regulators	9	-	-	-
GI_3	1189133	1201885	12752	DNA repair, phage related proteins	13	-	-	-
GI_4	2088396	2103156	14760	Thioredoxin, acetyltransferase, foldase, spore germination protein	22	+	+	+
GI_5	2385533	2391576	6043	Transcriptional regulators, resolvase, glycerate kinase	9	+	+	+
GI_6	2433224	2475066	41842	ECF transporters, sporulation, bacitracin transport permease, alcohol dehydrogenase, transcriptional regulators, teicoplanin resistance, chitosanase, acetyltransferases	40	+	+	-
GI_7	2680810	2703932	23122	Phage related proteins, sporulation, transcriptional regulators	31	-	-	-
GI_8	2871606	2888740	17134	Membrane proteins, beta-lactamase, transcriptional regulators, acetyltransferase	20	-	-	+
GI_9	3067327	3076262	8935	Membrane protein, phage protein, sporulation protein, ABC transporters, methyltransferase	11	+	+	+
GI_10	3372953	3377969	5016	Transcriptional regulators CidAB and CidR, nudix hydrolase, phage proteins	8	+	+	+
GI_11	3395481	3401840	6359	Cell wall endopeptidase, phage protein, transcriptional regulator	11	+	-	-
GI_12	3518089	3543217	25128	Riboflavin kinase, membrane zinc metalloprotease, ATP-dependent proteases, translation factors, DNA polymerase, recombinase	25	+	+	+
GI_13	4200693	4235031	34338	Transcriptional regulators, cell wall protein, multidrug resistance protein	32	+	+	+
GI_14	4323253	4344526	21273	Chorismate mutase, phage protein, aminopeptidase, thioredoxin, ribonuclease III, translation protein	24	+	+	+
GI_15	4808599	4827887	19288	Phage related proteins, serine/threonine kinase	19	-	-	-

thuringiensis BMB171 (**B**) and *B. cereus* Q1 (**Q**)

Table S5. Genomic islands and their features identified in *Bacillus* sp. *B25* non-assembled scaffolds

Label	Scaffold	Start	End	Length	Key features	Number of CDS
GI_1	ppB25_1	48295	55539	7244	Mobile elements, Sulfur carrier protein adenyltransferase ThiF, serine protease epiP precursor, rod shape-determining protein MreC	10
GI_2	ppB25_1	104233	134227	29994	Mobile elements, transcriptional regulators, methyltransferases, penicillin-binding protein, LexA repressor	42
GI_3	ppB25_2	61213	67097	5884	Mobile elements	11
GI_4	ppB25_3	35829	47237	11408	Ada regulatory protein, tyrosine recombinase XerC	12
GI_5	ppB25_5	19495	27427	7932	Transcriptional regulators, integrase/recombinase, transition state regulatory protein, permease of the drug/metabolite transporter	11
GI_6	ppB25_7	16951	20723	3772	Phage proteins, transcriptional regulator	9
GI_7	ppB25_8	14670	20667	5997	Macrolide glycosyltransferase, spore germination protein, methyl-accepting chemotaxis protein, signal transduction histidine kinase	9
GI_8	ppB25_9	18029	23418	5389	Integrase/recombinase, XpaF1 protein, spore cortex-lytic enzyme CwlJ	8
GI_9	ppB25_13	946	4517	3571	Acetyltransferases, possible DNA-binding protein, phage protein	8

2.4.4 Genes involved in antagonism

To compare the genetic information related to antagonism between *B25* and the *Bacillus cereus* group strains (BMB171 and Q1), *B. bombysepticus* Wang and the biocontrol agents *B. amyloliquefaciens* M27, *B. subtilis* BAB-1, *Pseudomonas protegens* Pf-5, and *Serratia plymuthica* AS9, their proteomes were compared. The comparison was then focused on 36 genes related to biofilm production, siderophores (bacillibactin and petrobactin), extracellular enzymes (glycoside hydrolase, chitinase, and chitosanase) and antibiotics (surfactin, fengycin, and iturin) (Table 2). All strains share genes involved in bacillibactin production except

Pf-5, which lacks two of the five genes comprising this operon. *B25*, Wang, and BMB171 also contain all genes related to petrobactin production. M27 and AS9 contain only one and two genes involved in petrobactin production, respectively (Table 2). Regarding lytic activity, the *B. cereus* group strains, *B. bombysepticus* Wang and *S. plymuthica* AS9 share chitinases. The *B. cereus* group, including the Wang strain share a chitosanase, excluding Q1. *B25*, BMB171, and *B. subtilis* BAB-1 that contain a possible endoglucanase, with a domain of glycoside hydrolase family 1 (GH1) (Table 2).

B25, Wang, BMB171 and *B. amyloliquefaciens* M27 own the complete operon for surfactin production (*SrfAABCD*). Pf-5 and BMB-1 presented only one and two out of the four genes for surfactin production. Despite that fengycin and iturin are common in *Bacillus* sp., genes for these antibiotics were not identified in any other strain. M27 was the only strain with all genes for production of the antibiotics surfactin, iturin, and fengycin (Table 2). *B25*, BMB171 and Q1 have all the genes of the operon for biofilm formation *sipW-TasA*, Wang genome lacks an hypothetical protein, and BAB-1 and M27 have only *SipW*, *TasA*-like 2, and *SinR*, whereas strains Pf-5 and AS9 lack all biofilm formation genes (Table 2).

Table 2. Comparative analysis of key genes involved in potential fungal antagonism activities in *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Serratia* strains.

Functional protein	Genes	B25	Wang	BMB171	Q1	M27	BAB-1	Pf-5	AS9	
Siderophores	Bacilibactin ¹	<i>DhbC</i>	+	+	+	+	+	-	+	
		<i>DhbB</i>	+	+	+	+	+	+	+	
		<i>DhbA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
		<i>DhbE</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>DhbF</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	Petrobactin ¹	<i>AsbA</i>	+	+	+	-	-	-	-	+
		<i>AsbB</i>	+	+	+	-	-	-	-	+
		<i>AsbC</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
		<i>AsbD</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
		<i>AsbE</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>AsbF</i>		+	+	+	-	+	-	-	-	
Lytic enzymes	Endoglucanase ²	Glycoside hidrolase	++	-	+	-	+	-	-	
	Chitosanase ²	<i>Csn</i>	++	+	+	-	-	-	-	
	Chitinases ²	<i>Chitinase A</i>	+	+	+	+	-	-	+	
		<i>Chitinase B</i>	+	+	+	+	-	-	-	++
Surfactin ¹	<i>SrfAA</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	
	<i>SrfAB</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	
	<i>SrfAC</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	
	<i>SrfAD</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	
Antibiotics	Fengycin ¹	<i>FenA</i>	-	-	-	-	+	-	-	
		<i>FenB</i>	-	-	-	-	+	-	-	
		<i>FenC</i>	-	-	-	-	+	-	-	
		<i>FenD</i>	-	-	-	-	+	-	-	
Iturin ¹	<i>ItuA</i>	-	-	-	-	+	-	-		
	<i>ItuB</i>	-	-	-	-	+	-	-		
	<i>ItuC</i>	-	-	-	-	+	-	-		
SFP ^{2,*}	<i>sfp</i>	+	+	+	-	+	+	+		
Biofilm formation	TasA ¹	<i>SipW</i>	+	+	+	+	+	-	-	
		<i>TasA</i> -like 2	+	+	+	+	+	+	-	
		Hypothetical protein	+	-	+	+	-	-	-	
		<i>TasA</i> -like 1	+	+	+	+	-	-	-	
		<i>SinR</i>	+	+	+	+	+	+	-	
		<i>SinI</i>	+	+	+	+	-	-	-	

B25: *Bacillus* sp. B25, **Wang:** *B. bombysepticus* Wang, **BMB171:** *B. thuringiensis* BMB171, **Q1:** *B. cereus* Q1, **M27:** *B. amyloliquefaciens* M27, **BAB-1:** *Bacillus subtilis* BAB-1, **Pf05:** *Pseudomonas protegens* Pf05, **AS9:** *Serratia plymuthica* AS9

¹ Operon genes components

² individual genes

* SFP = 4'-phosphopantetheinyl transferase

+ Gene present in the genome sequence. Double + means a duplicate gene

- Gene absence in the genome sequence

2.5 DISCUSSION

2.5.1 B25 Genome Properties and Phylogeny

The complete genome of *Bacillus* sp. B25 provided new insights into the potential metabolites that it can produce related to biocontrol activity. The genome size, gene and GC-content are consistent with those of previously published *Bacillus* spp. genomes. Based on the performed phylogenetic analysis, B25 is part of the *B. cereus* group, located close to *B. thuringiensis* (BMB171, HD-29, and HD73) and *B. cereus* (ATCC 14579, FORC 005, and B4264), and also to the *B. bombysepticus* Wang strain. A significant synteny between B25, BMB171, and Wang and non-significant synteny with Q1 was found. Although synteny has been demonstrated among the *B. cereus* group, some studies have evidenced differences in gene order, chromosomal rearrangements, and nucleotide variations (Rasko *et al.*, 2005). *B. bombysepticus* has not been included in the *B. cereus* group but our MLPA and genome comparison results suggest that Wang is close to the *B. cereus* group, but this requires further confirmation.

Despite their phenotype and particular properties, strains of the *B. cereus* group share a considerable amount of genetic information (Gohar *et al.*, 2005; Priest *et al.*, 2004). In this work, B25 shares 70–75% of its genome with *B. thuringiensis*, *B. cereus*, and *B. bombysepticus* Wang, a high percentage compared to other bacteria (Loper *et al.*, 2012), so their differences could be based only on a few genes.

Unique genes from B25, including transcriptional regulators, membrane proteins, and motility, as well as those genes involved in lytic enzymes activity, should be analyzed further to determine their differential role in biocontrol activity. These are allocated in the GIs (Table S4) along with integrative and conjugative elements, transposons, multidrug resistance and some phage-related genes (Juhas *et al.*, 2009). Those are commonly acquired by horizontal gene transfer encoding adaptative traits that may be beneficial under certain growth or environmental

conditions (Schmidt and Hensel, 2004).

Type I CRISPR-Cas system is considered as a unique defense mechanism against foreign DNA and in bacterial stress responses and virulence (Louwen *et al.*, 2014; Marraffini 2015). The presence of three CRISPR elements in *B25* confirms the importance of resistance to exogenous DNA in this strain. It remains to learn if the CRISPR spacers play a role in controlling horizontal gene transfer of plasmids and prophages found in *B25* genome. The fact that the other strains do not contain a CRISPR-Cas system suggest that *B25* could represent a separated phylogenetic sub-lineage within *B. cereus* group.

2.5.2 Genes Associated with Fungal Antagonism

We identified common and specific genes related to bio-control activities in *B25*. At the genetic level, the most conserved mechanisms among all *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Serratia* strains were bacillibactin, some lytic enzymes, surfactin, and biofilm formation. Siderophores such as bacillibactin play a key role for antagonism and have been reported in several species (Chu *et al.*, 2010) including *B. amyloliquefaciens* SQR9 (Li *et al.*, 2014). The siderophore petrobactin has also been considered as vital for iron acquisition and virulence in *B. anthracis* (Lee *et al.*, 2011). The fact that *B25* has 11 genes involved in siderophore synthesis suggests that this antagonistic mechanism may be of importance against fungal pathogens in *B25*.

Most bacteria produce lytic enzymes that can hydrolyze a wide variety of polymeric compounds, including chitin, proteins, cellulose, lipids, and glucans, the major components of the fungal cell wall (Adams, 2004), and the presence of these enzymes is expected to suppress phytopathogen growth (Lee *et al.*, 2013b). *B25* possesses two complete genes coding for chitinases, which may be playing a key role in fungal growth inhibition (Downing *et al.*, 2000). *B25* chitinase genes transcript levels are induced in response to the addition of chitin and *Fv* fungal lysates (Figueroa-López *et al.*, 2017) confirming a potential role for these genes to

control this plant fungal pathogen. In parallel, *B25* could also degrade the fungal cell wall with the help of a chitosanase gene. Orthologous chitosanase sequences have been reported as involved in biocontrol against *F. oxysporum* and *Rhizoctonia solani* (Gao *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2001). Considering that *B25* also has a putative endoglucanase, and the reported effectiveness of this lytic enzyme against a wide range of fungi (Rahman *et al.*, 2016), it is possible that *B25* possesses a strong mechanism based on cell wall degradation to control the fungal development through chitinase, chitosanase, and glucanase activity. Further analyses are necessary to investigate the role of these genes in lytic enzyme activity.

Antibiotic production seems to be the less conserved biocontrol mechanism among compared strains. *Bacillus amyloliquefaciens* M27 is the only strain that has the necessary genes for the surfactin, iturin, and fengycin biosynthesis. *B25*, Wang, and BMB171 have the necessary genes for surfactin biosynthesis. Surfactin synthesis requires the expression of four structural genes present in the operon *SrfAABCD* and is a key biocontrol mechanism of *B. amyloliquefaciens* SQR9 (Li *et al.*, 2014). The activity of the biocontrol agent *B. subtilis* SG6 against *F. graminearum* has been associated with the co-production of chitinase, fengycin, and surfactin (Zhao *et al.*, 2014). Even though fengycin is not present in *B25*, the activity of chitinase and surfactin could be an important complement for *B25* exerting fungal antagonism. Bacillibactin, surfactin, and other non-ribosomal peptides also require the presence and expression of the *sfp* gene (a phosphopantetheinyl transferase) (Li *et al.*, 2014). *Sfp* was identified in *B25* (Table 2), and its role in bacillibactin production in this strain remains to be known.

Biofilm formation is the first step of endophytic bacteria to colonize roots (Gao *et al.*, 2015) and it can help to mediate plant protection against environmental factors (Hall-Stoodley *et al.*, 2004) and plant diseases (Bais 2004; Chen *et al.*, 2013). In *B25*, the identified *sipW-tasA* operon and regulatory genes *sinR* and *sinI* could be determinant for *Fv* biocontrol mechanisms involving cell–cell communication via *quorum sensing* and production of antifungal metabolites (Danhorn and Fuqua,

2007). Once *B. subtilis* colonizes roots, it forms a stable and extensive biofilm and produces surfactin, which could protect the plant from pathogenic organisms (Bais, 2004). Hence, the discovery of genes related to biofilm formation in *B25* is crucial to understand its role as an effective biocontrol agent.

As far as we know, this work is the first comparative genome analysis between strains belonging to the *Bacillus cereus* group and other biocontrol agents. The data here reported demonstrate that *B25* contains the genes necessary for controlling the growth of phytopathogenic fungus, including competence for nutrients, mycoparasitism, antibiosis, and biofilm formation. Despite its genera and species, these mechanisms are ubiquitous among biocontrol strains. The *B25* genomic analysis provides the basis for further studies on gene expression of *B25* during its interaction with *Fv*, as well as to analyze the activity of the genes identified here to elucidate the mechanisms that *B25* uses to control *Fv*.

CAPÍTULO III

PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DEL AGENTE DE BIOCONTROL *Bacillus* sp. CEPA B25 EN RESPUESTA A LA INTERACCIÓN CON *Fusarium verticillioides*

Douriet- Gámez N. R., Calderón-Vázquez C. L., Larralde-Corona C. P., López-
Meyer M., Maldonado-Mendoza I. E.

En preparación

3.1 RESUMEN

Bacillus spp. es un miembro importante del grupo de PGPRs por su capacidad de producir una amplia gama de metabolitos capaces de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos. Tales como antibióticos, enzimas líticas, sideróforos y la producción de biopelículas. *Bacillus* sp. cepa *B25* es un agente de control biológico capaz de controlar al hongo fitopatógeno *Fusarium verticillioides* cepa P03, cuyo genoma contiene genes para los principales mecanismos de biocontrol, como quitinasas, glucanasas, quitosanasas, sideróforos, y antibiótico. El objetivo de este trabajo fue identificar los mecanismos específicos que *B25* emplea para el control de P03. Para esto se realizaron dos experimentos de interacción entre *B25* y P03 en donde ambos microorganismos se crecieron en medio de cultivo líquido. En el primer experimento la bacteria se creció en contacto directo con el hongo (interacción directa, BP), mientras en el segundo experimento, *B25* y P03 interactuaron de manera indirecta a través de una membrana de celulosa semipermeable (interacción por membrana, BPM). Se tomaron muestras de *B25* en ambos experimentos y se llevó a cabo un análisis de RNA-seq entre cada tratamiento y su respectivo control. Además, se probaron los sobrenadantes de *B25* durante los experimentos para analizar el efecto de los compuestos bioactivos secretados por dicha cepa en la germinación de esporas de P03. Los resultados mostraron una tendencia de inhibición a la germinación de esporas influenciada mayormente por el contacto directo de *B25* con P03 a las 6 h de interacción. En este mismo tiempo de muestreo, se observó la sobreexpresión de algunos genes asociados con sideróforos y transporte activo de hierro durante la interacción indirecta de *B25* con P03 a través de membranas, asociando a estos compuestos con la afectación en la germinación de esporas, así como su posible implicación en la respuesta temprana de *B25* ante la presencia de P03. Es posible que la presencia de material fúngico en la muestra tomada del tratamiento BP haya influido en el hecho de que no se observó sobreexpresión de genes en *B25* durante su interacción directa con P03. Muchos de los genes implicados en los mecanismos antigúngicos predichos en el análisis genómico no se observaron inducidos en los análisis transcriptómicos, posiblemente porque estos fueron

realizados en una etapa demasiado temprana en la interacción, por lo que se sugiere realizar en el futuro, el análisis de expresión de genes en tiempos de interacción más avanzados.

3.2 INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son un grupo de bacterias que colonizan la rizósfera y promueven el crecimiento de plantas controlando enfermedades transmitidas por el suelo, principalmente por hongos, que son de gran importancia en la microbiología básica y aplicada (Berg, 2009; Lugtenberg y Kamilova 2009). Muchas cepas de *Bacillus* spp. son miembros importantes del grupo de PGPRs y han sido explotados comercialmente como biofertilizantes y agentes de control biológico (Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015; Pérez-García *et al.*, 2011; Yáñez- Mendizábal *et al.*, 2012). Esto se debe a su capacidad de producir una gama de metabolitos que controlan el crecimiento de hongos fitopatógenos. Numerosas investigaciones han informado sobre la actividad antifúngica de una amplia variedad de especies bacterianas. La producción de antibióticos es una estrategia biológica efectiva para la supresión de enfermedades de plantas (Dowling y O'Gara, 1994; Fravel, 1988), así como también lo es la producción de enzimas líticas como quitinasas, glucanasas y quitosanasas, la producción de sideróforos y la producción de biopelículas (Gao *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

Las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS) han proporcionado nuevas oportunidades para realizar la secuenciación de genomas completos y para investigar genes específicos de control biológico. La secuenciación completa del genoma de varias cepas de *Bacillus* y otros agentes de control biológico ha revelado genes funcionales implicados en la promoción del crecimiento y control de enfermedades (Dunlap *et al.*, 2015; Lefort *et al.*, 2014). Pero si bien el análisis genómico nos ofrece un amplio panorama de los posibles mecanismos implicados en el control de hongos fitopatógenos, la secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) permite analizar mecanismos específicos desde sus niveles de expresión durante determinada condición (Wilhelm y Landry, 2009), como los genes implicados en la interacción de un agente de control biológico con un organismo fitopatógeno (Neupane *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

Algunos de estos estudios transcriptómicos han contribuido a la identificación de

mecanismos antifúngicos específicos en algunas cepas de *Bacillus* sp. (Zhi *et al.*, 2017), pero también en cepas de otros agentes de control biológico como *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas fluorescens* y diferentes cepas de *Lysobacter* spp. (Hennessy *et al.*, 2017; Neupane *et al.*, 2014; Puopolo *et al.*, 2017). Estos mecanismos son principalmente la síntesis de antibióticos, pero también genes implicados en la producción de enzimas líticas, así como genes implicados en metabolismo secundario y desintoxicación, asociado con mecanismos de defensa ante la presencia del hongo fitopatógeno.

Bacillus sp. cepa *B25* es una bacteria que ya ha sido probada como agente de control biológico en campo, con resultados favorables contra un hongo altamente patogénico que afecta al cultivo de maíz, *Fv* cepa P03 (Leyva - Madrigal *et al.*, 2014; Lizárraga-Sánchez *et al.*, 2015; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016). *B25* ha sido caracterizado a nivel genómico y se han identificado genes implicados en diversos mecanismo de control biológico como la producción de enzimas líticas, sideróforos, antibióticos y biopelículas (Douriet-Gámez *et al.*, 2018). Figueroa-López *et al.*, (2017), por su parte, reportó la participación de las quitinasas como un mecanismo que emplea *B25* para antagonizar a *Fv*. Sin embargo, es importante determinar si los demás mecanismos previamente identificados en el análisis genómico *B25* cumplen su función específicamente en el control del hongo fitopatógeno *Fv*.

Para ésto, en el presente trabajo, se empleó la metodología de RNA-seq, entre otras pruebas, para la identificación de genes expresados diferencialmente durante la interacción *B25*-P03, para así poder llegar a un mejor entendimiento de la interacción bacteria-hongo y poder aplicar métodos efectivos en un futuro en contra de este fitopatógeno.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Microorganismos y preparación de inóculos

El aislado *B25* se reactivó a partir de una alícuota criopreservada a -70 °C. Se tomó una muestra raspando el cultivo congelado con un asa bacteriológica estéril y se inoculó por estría cruzada en una placa Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) agar y se incubó por 24 h a 30°C. Se tomó una colonia aislada con un asa estéril y se inoculó una nueva placa de LB agar bajo las mismas condiciones de incubación. Esto se repitió cada vez que la cepa *B25* fue utilizada.

El aislado fúngico P03 de *Fv* se obtuvo de una planta de maíz con síntomas de fusariosis y se caracterizó como un hongo altamente patogénico para este cultivo (Leyva- Madrigal *et al.*, 2014). P03 se encuentra criopreservado a -70 °C en el medio de cultivo caldo dextrosa y papa (PDB) y glicerol. Se realizó un raspado del cultivo congelado y se colocó en una placa de Petri con medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA), se incubó por 7 días a 30 °C. Se agregaron 1-2 mL de agua destilada estéril sobre el micelio, esparciéndolo sobre toda la placa con ayuda de un asa estéril y se realizó una recolección del sobrenadante donde estaban suspendidas las esporas de P03. Las esporas fueron cuantificadas en cámara de Neubauer para conocer su concentración. Esto con el fin de obtener el material biológico para posteriores experimentos.

Para la preparación de inóculos, los cultivos de ambos microorganismos (*B25* y P03) se realizaron en tubos Corning (Sigma-Aldrich) con tapa con ventilación con capacidad para 50 mL, conteniendo 20 mL de caldo LB al 50%. Para obtener el inóculo de *B25*, se inoculó un tubo con una asada de un cultivo previo de 24 h. Para P03 se inoculó un tubo con la concentración necesaria de esporas de P03 para obtener una concentración final de 1×10^6 esporas mL⁻¹. Ambos tubos se incubaron a 30 °C por 24 h.

3.3.2 Sistemas de interacción de *B25-P03*

Para evaluar la respuesta genética de *Bacillus* sp. *B25* ante la presencia de la cepa P03 de *Fv*, se realizaron ensayos de interacción que constaron de dos tratamientos: interacción *B25-P03* a través de una membrana (BPM) y su tratamiento testigo de interacción de *B25* solo con la membrana (BM) sin la adición del hongo; y por otro lado, interacción directa de *B25-P03* (BP) y su tratamiento testigo de monocultivo de *B25* (B) (Figura 1). Ambos tratamientos se llevaron a cabo en tubos de 50 mL con tapa con ventilación, conteniendo 20 mL de caldo LB al 50%.

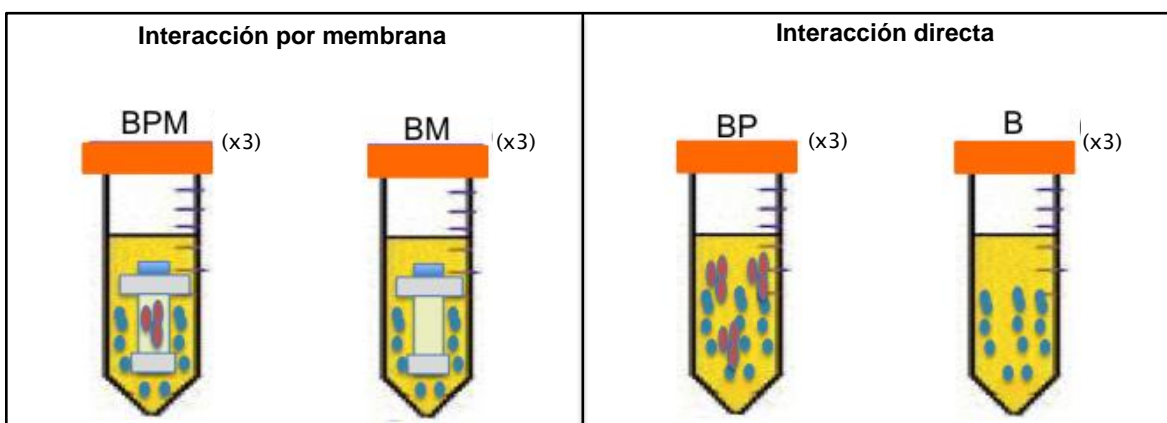


Figura 1. Tratamientos del sistema de interacción *B25-P03*. El bioensayo constó de dos tratamientos de interacción entre *B25* (círculos azules) y P03 (óvalos rojos). En el ensayo BPM el hongo se colocó dentro de la membrana tubular, mientras que la bacteria se ubicó en el espacio fuera de la membrana. El control de este ensayo consistió en agregar la bacteria pero sin hongo (BM). En el tratamiento de interacción directa entre *B25* y P03 (BP), ambos organismos (hongo y bacteria) se cocultivaron en el mismo espacio. El control de este tratamiento consistió en el cultivo de la bacteria sin hongo (B). Todos los tratamientos fueron preparados con 3 réplicas biológicas.

Para el tratamiento BPM/BM, la metodología llevada a cabo fue previamente reportada por (Larralde-Corona *et al.*, 2011) con modificaciones adaptadas a nuestro sistema biológico. El fundamento de la técnica es que ambos microorganismos interactúen mediante los metabolitos que producen, sin estar en

contacto físico, ya que estos pasan a través de una membrana de diálisis de la marca Float-A-Lyzer G2 (Spectrum Lab) con capacidad de 1 mL y un diámetro de 5 mm, de corte de poro que permite el paso de moléculas de hasta 100 kDa. Se inoculó a P03 dentro de la membrana, mientras que *B25* se inoculó en el medio de cultivo contenido en el tubo fuera de la membrana (Figura 1). Para el tratamiento BP/B, ambos microorganismos fueron inoculados directamente en el medio de cultivo. Para cada tratamiento, la concentración inicial de *B25* se ajustó a una densidad óptica de 0.05, partiendo de un cultivo previo de 24 h. Para P03, se inoculó 1 mL de cultivo de 24 h correspondiente a 2.8 gL^{-1} de micelio, dentro de la membrana para el tratamiento BPM/BM y directamente en el medio de cultivo para BP (Figura 1). Se prepararon tres réplicas biológicas de cada tratamiento y todos los tubos se incubaron a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y 250 rpm.

Se tomaron 2 mL de muestra del cultivo de *B25* de los tratamientos BPM, BM, B y del cultivo mixto BP a las 3, 6, 12, 24 y 30 h y se transfirieron a un tubo de 2 mL. Las muestras fueron centrifugadas, y las pastillas formadas fueron inmediatamente almacenados a $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y los sobrenadantes de cada muestra fueron recuperados, filtrados y almacenados a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores experimentos. Las pastillas de cada muestra fueron procesadas para realizar extracciones de RNA total.

Con el fin de descartar una posible contaminación cruzada de P03 por degradación de la membrana o mal manejo durante la preparación del experimento, se extrajo DNA de 1 mL del cultivo de *B25* en el tratamiento BPM (tres réplicas) a las 12 h y 24 h, para realizar pruebas de detección por PCR de *Fv* y bacterias, simultáneamente. Para la detección de P03, se utilizaron los oligonucleótidos Ver1 y Ver2 (Mulé *et al.*, 2004) que amplifican el gen de la calmodulina (fragmento esperado de 578 pb). Las condiciones de reacción y amplificación están reportadas por Leyva Madrigal *et al.*, (2014). Para la detección de *B25* se utilizaron oligonucleótidos específicos para la identificación de Firmicutes Fif369 y Fir1244 que amplifican un fragmento de 875 pb. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 μl conteniendo 10 ng de DNA, 1 mM

de MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, 0.4 μM de cada oligonucleótido y 1.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron de 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C por 1 min y 30 s, una temperatura de alineamiento de 56 °C por 1 min y 30 s, 1 min a temperatura de extensión de 72 °C y una temperatura de extensión final de 72 °C por 5 min. Como controles para ambas detecciones se utilizaron muestras de DNA genómico de P03 y B25 previamente identificadas. Todos los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa por la técnica de electroforesis y visualizados en un fotodocumentador con exposición a luz UV (Figura 2).

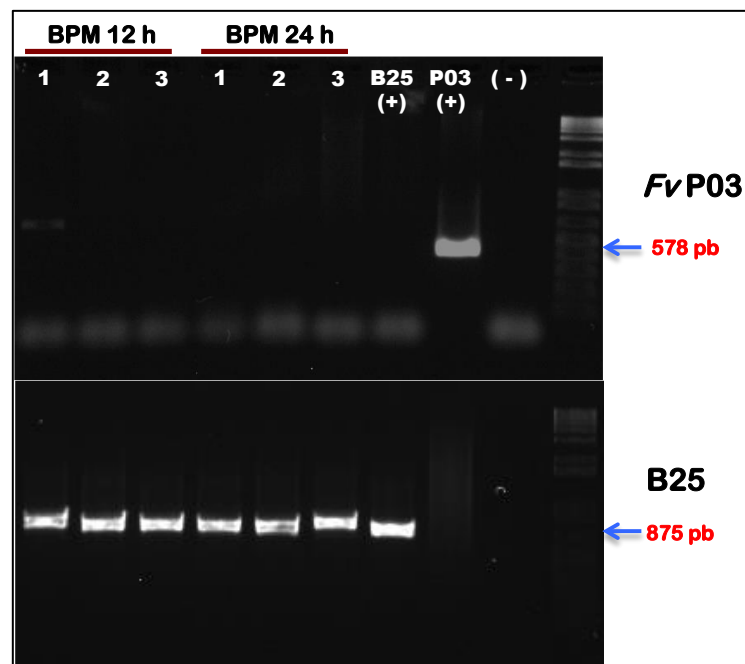


Figura 2. Verificación por PCR de la exclusión de contaminación cruzada por *Fv* cepa P03 en muestras de B25 en tratamiento BPM durante bioensayo de interacción B25-P03. No se detectó a *Fv* P03 en muestras de cultivo de B25 del tratamiento BPM (réplicas 1-3) a las 12h y 24 h de muestreo. Se utilizó como control positivo el DNA de P03 (+) y de B25 (+) que amplificaron fragmentos de 578 y 875 pb respectivamente. En el carril del control negativo (-) se cargó el control de la mezcla de reactivos sin el DNA templado.

Con el fin de visualizar la interacción de B25 y P03 al microscopio, se montó un experimento independiente, preparando nuevamente las muestras del tratamiento BP, con su respectivo control B agregando, además, un monocultivo de P03 (P) como control del hongo, siguiendo la misma metodología indicada anteriormente en cuanto a concentración de cada microorganismo y condiciones de crecimiento. Se tomaron 10 μ L de muestra de cada cultivo a las 3 y 6 h de interacción y se colocaron independientemente en un portaobjetos. Posteriormente, cada muestra se tiñó con azul de metileno al 0.05 %, se colocó un cubreobjetos y se procedió a visualizar cada muestra en el microscopio.

3.3.3 Extracción de RNA total de bacteria y análisis de calidad

Las muestras por triplicado colectadas de *B25* de cada tratamiento y sus controles respectivos (BPM, BP, BM y B) y almacenadas a -70 °C, fueron resuspendidas en buffer de lisis (15 mgmL^{-1} de lisozima, 30 mM de Tris-HCL y 1mM de EDTA), se incubaron a 37°C por 30 minutos y se mezclaron con vórtex para romper la pared celular. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de RNA con el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 15596-026, Waltham, MA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los RNAs fueron separados en gel de agarosa por la técnica de electroforesis y visualizados en un fotodocumentador con exposición a luz UV (Figura 3A). La cantidad y calidad de los RNAs se verificó en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) usando el kit comercial RNA 600 Nano del mismo fabricante y siguiendo las instrucciones del mismo, observando un número de integridad de RNA (RIN) >7.5 (Figura 3B), descartando la réplica 3 del tratamiento BPM, ya que no obtuvo la calidad deseada (datos no mostrados).

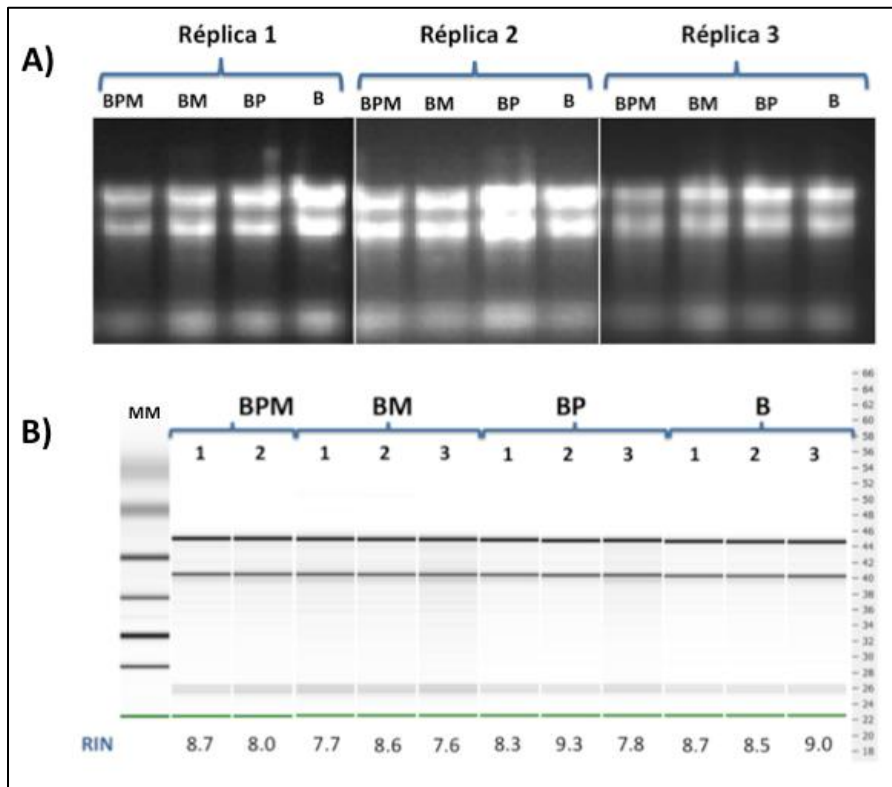


Figura 3. RNA total de muestras de *B25* colectadas a las 6 h de interacción con *P03*. Imagen muestra de RNA total de las tres réplicas de los tratamientos BPM (interacción por membrana) y BP (interacción directa) con sus respectivos controles BM y B, separadas por electroforesis en (A) un gel de agarosa al 1% y (B) en un chip de electroforesis en el equipo Agilent Bioanalyzer, en la cual, en la parte inferior se puede observar el valor de RIN (número de integridad de RNA). La réplica 3 del tratamiento BPM no fue mostrada por tener una menor calidad a la esperada (>7.5).

3.3.4 Preparación de bibliotecas, secuenciación de RNA y análisis de datos de RNA-seq

Se realizó una mezcla de tres réplicas de RNA del tratamiento BP y los controles BM y B, así como las dos réplicas del tratamiento BPM, proveniente de las muestras colectadas a las 6 h de interacción de *B25* con *P03* y ésta se utilizó como templado para llevar a cabo la síntesis de la primera y segunda cadena de DNA complementario (cDNA) usando el kit ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis y el kit NEBNext® mRNA Second Strand Synthesis Module,

respectivamente (New England Biolabs, Inc., Cat. E6560S y E6111S), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se llevó a cabo una preparación de las cuatro bibliotecas de cDNA utilizando el Kit TruSeq Nano DNA (Illumina) para después secuenciarse en la plataforma NextSeq (Illumina) en formato *pair-end* 2 x 150.

Todas las lecturas obtenidas de la secuenciación, por biblioteca, se limpiaron y filtraron por calidad mediante el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), de acuerdo a los siguientes parámetros: operación de Trimmomatic = SLIDINGWINSOW y MINLEN, número de bases para promediar = 4, calidad promedio requerida = 25, y longitud mínima de lecturas = 30. Posteriormente se llevó a cabo un mapeo o alineamiento de las lecturas anteriormente filtradas contra el genoma de referencia de *Bacillus* sp. cepa B25 (CP016285.1) usando el programa Bowtie2 y utilizando parámetros estándar (Langmead y Salzberg, 2012). A continuación se realizó un ensamblado de transcritos y estimación de su abundancia mediante el programa HTSeq-count (Anders *et al.*, 2015), considerando los siguientes parámetros: modo para manejar lecturas superpuestas = unión y valor mínimo de calidad de alineamiento = 10. Finalmente se llevó a cabo el análisis de expresión diferencial de los datos obtenidos de los tratamientos BPM-BM y BP-B, respectivamente, utilizando el programa DESeq2 (Love *et al.*, 2014) con parámetros estándar.

3.3.5 Efecto de compuestos bioactivos de *Bacillus* sp. B25 sobre germinación de esporas de *Fv* P03

Para evaluar la excreción y efectividad de compuestos bioactivos (enzimas o compuestos antifúngicos) en B25, influenciados por la presencia de P03, se probaron los sobrenadantes obtenidos en el bioensayo de interacción de los tratamientos BPM y BP con sus respectivos controles BM y BP, a las 6 horas de muestreo, sobre la germinación de esporas de P03. El experimento se realizó en tubos de 1.5 mL estériles en un volumen de 1 mL de medio de cultivo a una concentración final de 1×10^3 esporas mL⁻¹. El medio de cultivo contenía el 50% de

sobrenadante y el 50% de medio de cultivo caldo LB completo. Como control del experimento, se sustituyó la cantidad de sobrenadante por agua destilada estéril mezclada con caldo LB. Cada tratamiento se repitió tres veces. Los tubos fueron incubados a 30 °C y se tomaron 100 µL de muestra a las 8, 12, 18 y 24 h para la determinación de la tasa de germinación de P03 en el tiempo, siguiendo el protocolo de Larralde-Corona *et al.*, (2011). Esto se determinó microscópicamente, midiendo el porcentaje de germinación de aproximadamente 100 esporas, las cuales se consideraban germinadas cuando la longitud del tubo germinal era igual o mayor que el diámetro de la esporas (Pacheco *et al.*, 2008). Cada experimento, utilizando los sobrenadantes de 6 horas de muestreo del bioensayo de interacción, respectivamente, se realizó de manera independiente. Todos los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa SAS mediante un análisis de varianza. La diferencia significativa entre las medias se comparó con la prueba de rangos múltiples de Duncan a $p < 0,05$.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Efecto de los sobrenadantes de 6 h de B25 del bioensayo de interacción sobre la germinación de esporas de Fv P03

Se analizó el efecto de los sobrenadantes de B25 provenientes del bioensayo de interacción con P03, correspondientes a tratamientos de interacción por membrana (BPM) e interacción directa (BP) con sus respectivos controles (BM y B) colectados a las 6 h de incubación, sobre la germinación de esporas de Fv. Se observó que el sobrenadante de BP redujo significativamente ($p < 0.05$) la germinación de Fv con respecto al control en cada tiempo de evaluación (8, 12, 18 y 24 h), equivalente a una reducción del 51, 46, 33 y 25% de la tasa de germinación de esporas, respectivamente (Tabla 1, Figura 3). A las 24 h de incubación de las esporas con los distintos sobrenadantes, se observa que al igual que BP, los sobrenadantes de 6h de los tratamientos BPM, BM y B también reducen significativamente la germinación de esporas con respecto al control

Tabla 1. Efecto de sobrenadantes de 6 h de *B25* del bioensayo de interacción sobre la germinación de esporas de P03

Tratamiento	Tiempo (h)				
	8	12	18	24	
Control	22.5 ± 2.5 EFG	27.8 ± 4.8 BCDE	33.3 ± 6.1 BCD	46.2 ± 3.4 A	A
BPM	15.7 ± 1.4 FGH	18.3 ± 2.3 EFGH	24.2 ± 7.6 DEFG	35.8 ± 2.4 B	BC
BM	18.2 ± 4.2 EFGH	21.3 ± 0.8 EFG	27.0 ± 1.1 BCDE	35.2 ± 4.4 B	B
BP	11.0 ± 1.8 H	15.0 ± 2.5 GH	22.3 ± 2.7 EFG	34.5 ± 5.8 BC	C
B	19.2 ± 5.4 EFGH	24.8 ± 2.3 DEF	25.7 ± 4.3 CDE	33.3 ± 7.2 BCD	B

Valores con letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre tratamientos por tiempo de muestreo a una $p < 0.05$, según el análisis de rangos múltiples de Duncan, mientras que las letras en color azul indican si existe diferencia o no entre tratamientos de manera global.

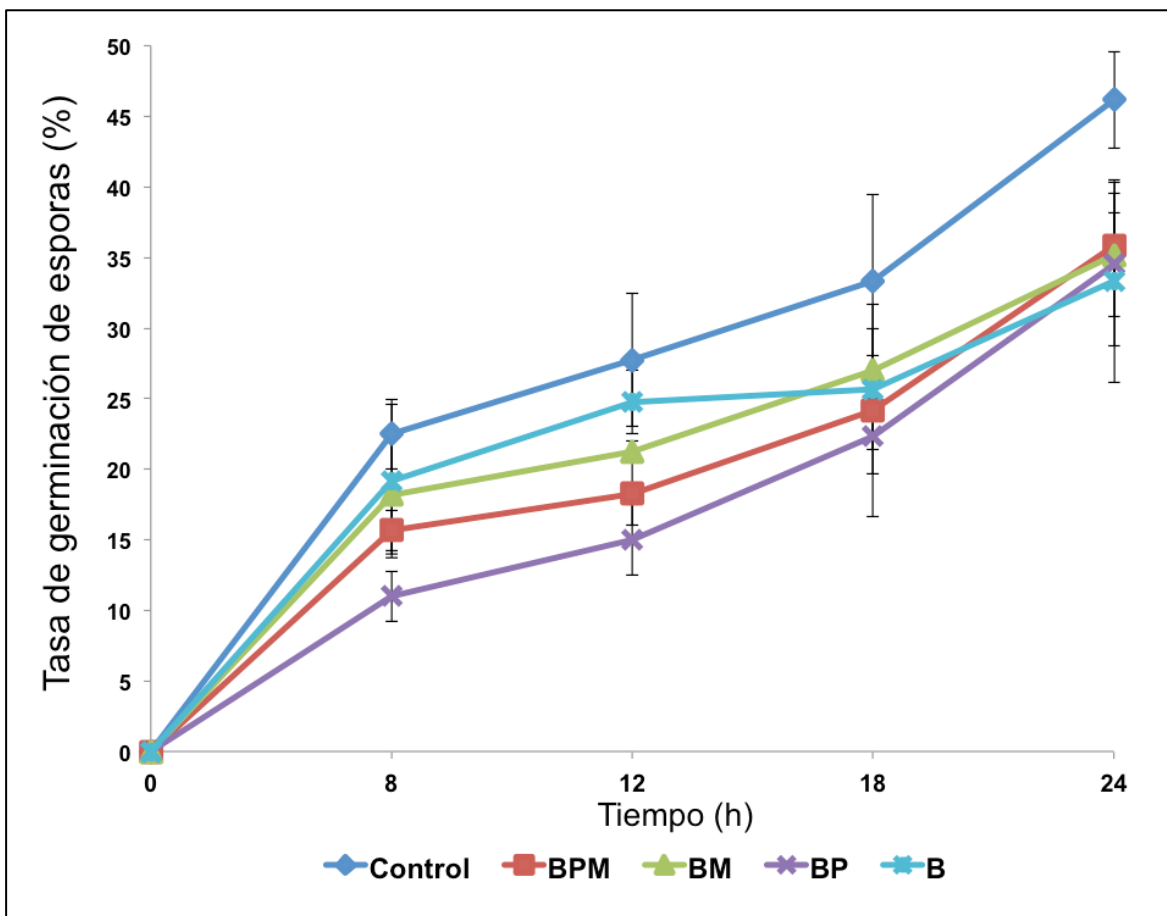


Figura 3. Efecto de sobrenadantes de 6 h de *B25* del bioensayo de interacción sobre la germinación de esporas de P03. La gráfica muestra la respuesta de esporas de *Fv* P03 tratadas con sobrenadantes de *Bacillus* sp. *B25* colectados de distintos tratamientos de un bioensayo de interacción entre *B25* y P03, a las 6 h de incubación. Las etiquetas indican los tratamientos del bioensayo de donde fueron colectados los sobrenadantes de *B25*. BPM: interacción P03- *B25* por membrana, BM: control de de BPM (sin P03), BP: interacción directa *B25*-P03, B: control de BP (sin P03), Control: Agua destilada. Las barras en las líneas de cada tratamiento indican el error estándar de las medias de las tres réplicas de cada tratamiento en cada tiempo de observación (8h, 12h, 18h y 24h).

3.4.2 Respuesta genética de *Bacillus* sp. *B25* ante la presencia de *Fv* P03

Para analizar la respuesta genética de *B25* durante su interacción con P03 se llevó a cabo un análisis de RNA-seq de las bibliotecas provenientes de la interacción a través de una membrana (BPM/BM) y de su interacción directa (BP)

a las 6 h de incubación, en la plataforma NextSeq (Illumina). Se obtuvo un total de 63 Gpb con un rendimiento aproximado de 15.7 Gbp por biblioteca. Después de realizar los procesos bioinformáticos correspondientes como limpieza de lecturas, mapeo contra genoma de referencia de *B25*, estimación de abundancia de transcritos, hasta analizar la expresión diferencial de genes de cada tratamiento con su respectivo control, en el tratamiento de interacción por membranas BPM se observó la expresión diferencial de apenas nueve genes con respecto al control BM, con un valor de *fold change* (sobreexpresión), de poco más de 2 (Tabla 2). La lista de genes diferenciales está conformada por dos genes codificantes para proteínas hipotéticas, tres genes implicados en la biosíntesis de sideróforos y transporte activo de hierro, un gen codificante para una lisina 2,3-amino mutasa, un gen para una glutamato N-acetyltransferasa, un gen para argininosuccinato liasa y un gen implicado en el transporte activo de potasio. Además, se observó también un gen con un valor debajo de -2 (represión), codificante para una ATPasa de translocación de cobre (Tabla 2). En la Tabla 3 se enlistan genes que no tuvieron un valor de *fold change* mayor a 2, pero con tendencia a la sobreexpresión, en cuya lista destacan algunos genes asociados con reguladores transcripcionales, una bacilolisina así como transportadores de nutrientes y sistemas de captación de hierro asociados con sideróforos.

No se observó expresión diferencial de genes en el tratamiento de interacción directa BP con respecto a su control B. Sin embargo, en la Tabla 4 se muestran los genes con una mayor expresión en BP con respecto al control, en cuya lista destacan aquellos genes asociados con un dominio catalítico de familias glicosil hidrolasas GH35-38, un represor transcripcional del operón trehalosa y cuatro genes asociados con quimiotaxis y flagelos.

Tabla 2. Genes de *Bacillus* sp. B25 en interacción por membrana (BPM/BM) con Fv P03 con una expresión direferencial significativa (>2)

Identificador	Descripción	Valor de <i>fold change</i>
BspB25.3299	Proteína hipotética	2.16
BspB25.2110	Lisina 2,3-amino mutasa	2.12
BspB25.3907	Glutamato N-acetiltransferasa	2.12
BspB25.4146	Transportador tipo ABC de Fe ³⁺	2.12
BspB25.2166	2,3-dihidro-2,3-dihidrobenzoato deshidrogenasa para la biosíntesis de sideróforos	2.10
BspB25.1290	Proteína hipotética	2.10
BspB25.4147	Transportador tipo ABC de Fe ³⁺ - hidroxamato	2.10
BspB25.4403	Argininosuccinato liasa	2.00
BspB25.645	ATPasa de transporte de potasio subunidad C	2.02
BspB25.3499	ATPasa de translocación de cobre	-2.16

Tabla 3. Genes de *Bacillus* sp. B25 en interacción por membrana (BPM/BM) con Fv P03 con tendencia a una expresión direferencial

Identificador	Descripción	Valor de <i>fold change</i>
BspB25.2149	Metilcitrate sintasa	1.98
BspB25.2151	Metil-lisocitrato liasa	1.97
BspB25.4317	Proteína de pared celular IsdA2C	1.97
BspB25.950	Proteína hipotética	1.97
BspB25.3778	Homocisteína metiltransferasa	1.95
BspB25.2150	2-metilcitrate deshidratasa	1.95
BspB25.4319	Proteína de pared celular IsdC	1.94

BspB25.3661	Aspartato carbamoiltransferasa	1.93
BspB25.1289	Ferredoxina	1.91
BspB25.3927	Transportador ABC de membrana/permeasa	1.90
BspB25.3507	Sistema de captación hierro FeuA2C (bacilibactina)	1.89
BspB25.4440	Acetil-coenzima A sintetasa	1.89
BspB25.2154	Metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa	1.88
BspB25.2185	Transportador ABC - 2C proteína de unión a ATP	1.88
BspB25.1435	Menaquinona-citocromo C oxidoreductasa	1.87
BspB25.2356	Metilglutaconil-CoA hidratasa	1.87
BspB25.644	Transportador de Potasio	1.86
BspB25.2186	Transportador ABC - permease 2C	1.86
BspB25.2357	Metilcrotonil-CoA carboxilasa	1.86
BspB25.2644	Proteína hipotética	1.85
BspB25.1244	Internalina	1.85
BspB25.1623	Fumarato hidratasa	1.84
BspB25.4297	Proteína periplásmica de unión a ferricromo	1.81
BspB25.2358	Acetil-coenzima A sintetasa	1.81
BspB25.4523	Transportador ABC	1.79
BspB25.4318	Proteína de membrana IsdA1	1.78
BspB25.646	Histidina quinasa	1.77
BspB25.3660	Dihidroorotato deshidrogenasa	1.76
BspB25.5106	Bacilolisina	1.75
BspB25.577	Proteína de resistencia a múltiples antibióticos	-1.81
BspB25.871	Regulador MecR1	-1.88
BspB25.1215	Regulador sensible a lactato LldR	-1.93
BspB25.5202	Óxido nítrico sintasa	-1.93
BspB25.2842	Transporter ProP	-1.97

Tabla 4. Genes de *Bacillus* sp. *B25* en interacción directa (BP/B) con *Fv* P03 con mayor cambio de expresión sin considerarse una sobreexpresión.

Identificador	Descripción	Valor de <i>fold change</i>
BspB25.4922	N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	1.50
BspB25.3941	Fosfotransbutirilasa	1.44
BspB25.522	Proteína regulatoria Yych	1.42
BspB25.3940	Leucina deshidrogenasa	1.41
BspB25.885	Transportador de serina	1.40
BspB25.3938	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	1.40
BspB25.96	Proteína ribosomal SSU s7p	1.39
BspB25.4087	Proteína ribosomal SSU s21p	1.39
BspB25.4935	Dominio catalítico de familias GH35-38	1.39
BspB25.593	Proteína conservada no caracterizada	1.38
BspB25.540	Represor transcripcional del operón trehalosa	1.38
BspB25.1571	Proteína interruptora del motor flagelar Film	1.38
BspB25.629	Peptidasa de la familia M23	1.37
BspB25.4917	Proteína de interfaz de la subunidad ribosómica	1.37
BspB25.348	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilos	1.37
BspB25.278	Resistencia a múltiples antibióticos	1.36
BspB25.3270	Proteína de quimiotaxis aceptora de metilos	1.35
BspB25.4281	Proteína de rotación del motor flagelar MotB	1.35
BspB25.2152	Metilcrotonil-CoA carboxilasa	-1.51
BspB25.4149	Acohol deshidrogenasa	-1.46
BspB25.2153	3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa	-1.45
BspB25.1623	Acetoacetil-CoA sintetasa [leucina]	-1.40
BspB25.4868	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD	-1.40
BspB25.4135	Fenilalanina-4-hidroxilasa	-1.40

3.4.3 Adherencia de *B25* a estructuras celulares de P03

El cultivo dual de *B25* y P03, así como sus respectivos monocultivos fueron observados en un microscopio óptico con el fin de apreciar su interacción a las 3 y 6 h de incubación. Previo a la visualización, los microorganismos se tiñieron con azul de metileno, por lo que cada uno de sus estructuras fue claramente identificada (Figura 4). Las hifas de P03 fueron colonizadas por células de *B25* a las 3 y 6 h de interacción. Además, se pudo apreciar, principalmente a las 3 h de incubación, la tinción de ciertas sustancias de secreción por parte de *B25* en la muestra de cultivo dual, observándose en menor cantidad en las imágenes de cada monocultivo (hongo y bacteria). Es posible que estas le hayan permitido a *B25* adherirse a las hifas de P03, de acuerdo a lo observado a las 6h, lo cual podría estar asociado con la producción de biopelículas.

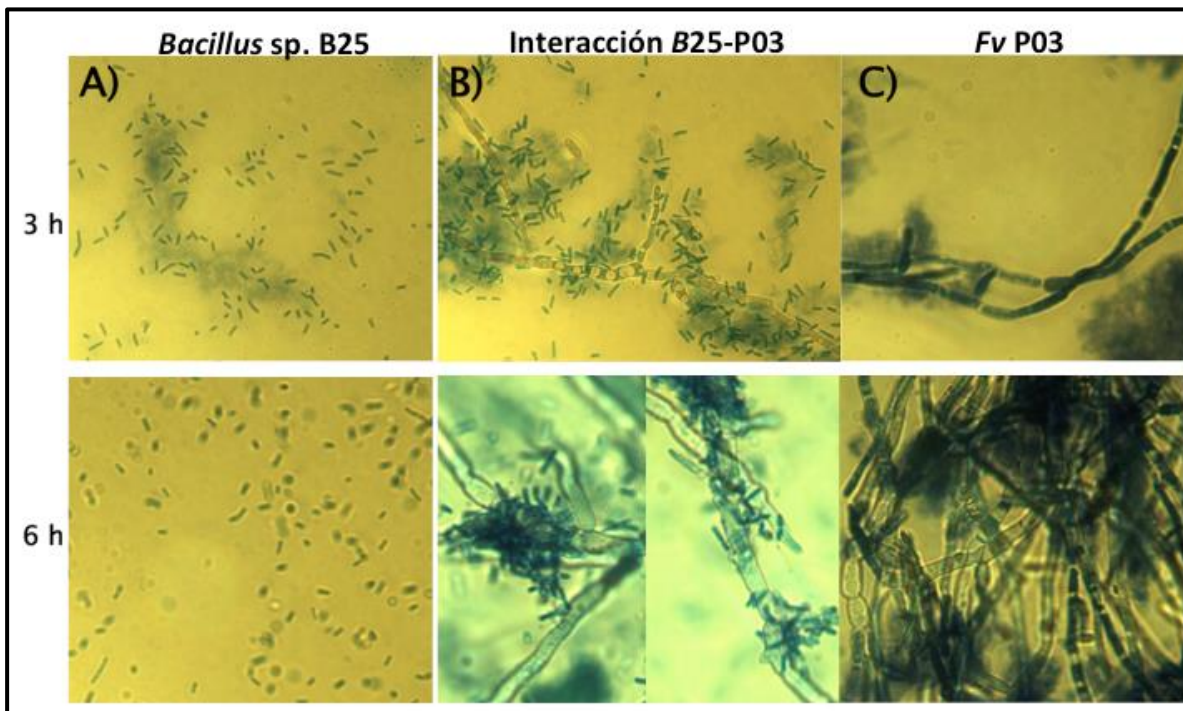


Figura 4. Interacción directa de *B25* y P03. Imágenes de microscopio de *Bacillus* sp. *B25* (A) y *Fv* P03 (C) así como su interacción (B), crecidos en medio de cultivo LB y observados a las 3 h (resolución de 100X) y 6 h (resolución de 400X) de incubación. Cada muestra fue colocada en un portaobjetos y teñida con azul de metileno previo a su observación al microscopio óptico.

3.5 DISCUSIÓN

Es ampliamente conocida la capacidad del género *Bacillus* para antagonizar hongos fitopatógenos mediante la secreción de diversos compuestos antimicrobianos. En el entendido que específicamente *Bacillus* sp. *B25* cuenta con un amplio arsenal de mecanismos de biocontrol como enzimas líticas, antibióticos, sideróforos y producción de biopelículas (Douriet-Gámez *et al.*, 2018), el objetivo planteado en este trabajo fue identificar los mecanismos específicos que *B25* utiliza para antagonizar al hongo altamente patogénico *Fv* P03.

Analizar una interacción sin contacto físico entre los dos microorganismos nos permitiría conocer aquellos mecanismos que se encienden en *B25* al detectar la presencia de P03, mientras que una interacción directa nos permitiría conocer aquellos genes implicados en dicha interacción. Según los resultados obtenidos en el análisis de los compuestos bioactivos presentes en el sobrenadante de *B25* en interacción con P03, durante las primeras 6 h de interacción directa, se induce la secreción de determinados compuestos en *B25* que inhiben o retrasan la germinación de esporas del hongo. Además, aunque no hubo diferencias significativas con respecto al control usando el sobrenadante de BPM (Tabla 1), se observó una tendencia en la reducción de germinación de esporas durante las primeras 18 h (Tabla 1, Figura 3), por lo que, incluso separados físicamente por la membrana, *B25* posiblemente respondió ante la presencia de P03, produciendo determinados compuestos antifúngicos, aunque en menor proporción, en comparación con lo observado en la respuesta de la germinación de esporas a sobrenadantes de interacción directa.

Dados los reportes previos sobre compuestos que degradan estructuras celulares fúngicas (esporas, hifas y pared celular), este hecho se le puede atribuir a la presencia en los sobrenadantes de enzimas líticas como quitinasas, quitosanasas y glucanasas (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). Otros estudios han asociado la inhibición en la germinación de esporas de distintos hongos como *Penicillium roqueforti*, *F. sambucinum* y *F. graminearum* a la presencia de lipopéptidos cíclicos como iturinas, fengicinas y surfactinas en sobrenadantes de distintas especies de

Bacillus, que actúan incrementando la permeabilidad en la membrana lipídica de las esporas, provocando la pérdida de macromoléculas esenciales, además de inducir daño micelial (Chitarra *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). En este caso, la acción podría atribuirse a las surfactinas que *B25* es capaz de producir.

Sin embargo, estos resultados no tienen correlación con los obtenidos en el análisis de RNA-seq, ya que no se identificaron genes expresados diferencialmente implicados en la producción de enzimas líticas ni antibióticos. No obstante, en la muestra de *B25* proveniente del tratamiento BPM se observó la sobreexpresión de tres genes implicados en la biosíntesis de sideróforos y transporte activo de hierro (Tabla 2), mientras que también se observó una tendencia a la sobreexpresión de dos genes implicado en sistemas de captación de hierro (Tabla 3). Se han reportado los efectos inhibitorios de sideróforos producidos por *Pseudomonas syringae* en la germinación de esporas de *F. oxysporum* (Yu *et al.*, 2017), mientras que Li *et al.*, (2014) identificaron la respuesta inhibitoria específica del sideróforo bacilibactina en contra del desarrollo de la misma especie de *Fusarium*. De acuerdo a lo observado en este estudio, los sideróforos producidos por *B25* podrían estar implicados en la respuesta temprana (durante las primeras 6 h de interacción) de la bacteria ante la presencia de *Fv*.

Figuroa-López *et al.*, (2017) observaron la sobreexpresión de genes codificantes para quitinasas en *B25* en respuesta a la presencia de pared celular de P03 y quitina coloidal después de 24 h de interacción. En este trabajo, de acuerdo a lo observado en la Tabla 1 y Figura 3, los sobrenadantes de *B25* no detuvieron completamente la germinación de esporas de P03 en ninguno de los tratamientos a las 24 h de medición, por lo que es posible que después de este tiempo sea cuando se manifieste una mayor expresión de genes implicados en micoparasitismo, por lo que es importante analizar muestras tomadas en tiempos más prolongados, ya que posiblemente se identifique la expresión de genes implicados con actividad de enzimas líticas, así como la sobreexpresión de genes relacionados con la producción de antibióticos.

Por otro lado, en el experimento de interacción directa de *B25*-P03 (BP/B) no se observó sobreexpresión de genes en *B25*, a pesar de haberse observado una mayor respuesta de los sobrenadantes de ese experimento sobre la germinación de esporas (Figura 2), es probable que el material genético del hongo, el cual se combinó con el de la bacteria, esté interfiriendo en los datos obtenidos de los análisis bioinformáticos. Por lo que se sugiere modificar los parámetros para el mapeo con el genoma de referencia de *B25*, con el fin de descartar dicha interferencia de datos.

Sin embargo, fue posible observar una ligera tendencia en la expresión de genes implicados en sistemas de captación de hierro asociados con glicosil hidrolasas de las familias GH35-38, que, en *Bacillus* sp. cepa MSP7 catalizan la hidrólisis de los residuos terminales β -galactosil de carbohidratos, galactolípidos y glicoproteínas, presentes en algunos hongos como *Aspergillus niger* (Daniel *et al.*, 1997). También se identificó la expresión de un represor transcripcional del operón de trehalosa, el cual es un disacárido ampliamente distribuido en la naturaleza, incluidas las bacterias y que se conoce que está implicado en interacciones entre bacterias y hongos sin propiciar competencia microbiana (Duffy *et al.*, 2004). También se ha estudiado el papel de este disacárido como indicador o señalización de la presencia de hongos (Gaballa *et al.*, 1997), por lo que la regulación de la producción de trehalosa mediante su inhibidor podría estar asociado con la interacción entre *B25* y P03, aún cuando su sobreexpresión no haya sido observada en este experimento. Por otro lado, sería interesante el seguimiento de la expresión de los genes asociados con quimiotaxis y flagelos (Tabla 4). Estos mecanismos se asocian entre sí para actuar en beneficio de las raíces de las plantas mediante la interacción con sus exudados. La quimiotaxis bacteriana proporciona una ventaja competitiva a las bacterias móviles flageladas en la colonización de la raíz e impulsa a estas a la colonización de las hifas de hongos fitopatógenos para ejercer su actividad antagonista (Polonio *et al.*, 2017). Estos mecanismos, además, podrían relacionarse con la producción de biopelículas, mecanismo ya identificado en el genoma de *B25* (Douriet-Gámez *et al.*, 2018), que, aunque no se observó la expresión diferencial de genes asociados

con esta actividad en ninguna de las condiciones analizadas, trabajos previos sugieren que una estrategia implementada por el agente de biocontrol *Serratia marcescens* cepa UENF-22GI para impedir el crecimiento de hongos, implica la formación masiva de biopelículas en las hifas de *F. oxisporum*, lo que facilita la adherencia, colonización y posterior degradación de su pared celular (Matteoli *et al.*, 2018). Este tipo de interacción entre B25 y P03 fue claramente observable al microscopio (Figura 4), donde identificaron ciertos productos de secreción de B25 luego de teñirse con azul de metileno al interactuar con las hifas de P03, así como la colonización de las mismas a las 6 h de interacción directa, similar a lo observado por Matteoli *et al.* (2018).

Se sugiere realizar análisis de expresión diferencial de genes específicos en B25 de los genes implicados en los mecanismos mencionados en tiempos más avanzados en la interacción con P03.

DISCUSIONES INTEGRADORAS

En el presente trabajo, se realizó la caracterización y comparación genómica del agente de biocontrol *Bacillus* sp. cepa *B25* y, además, se obtuvo un primer acercamiento a la respuesta transcriptómica de la misma ante la presencia del hongo fitopatógeno *Fv*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis de filogenia, sintenia, porcentaje de identidad de nucleótidos y comparación a nivel de genes, *B25* pertenece al grupo *Bacillus cereus* y se encuentra estrechamente relacionado con cepas de las especies *B. thuringiensis* (BMB171, HD-29 y HD73) y *B. cereus* (ATCC 14579, FORC 005 y B4264), así como de la cepa *B. bombysepticus* Wang., confirmando el conocimiento previo de que el grupo *B. cereus*, en general, comparte una cantidad considerable de información genética (Gohar *et al.*, 2005; Priest *et al.*, 2004); específicamente *B25* comparte del 70 al 75% de su genoma con las cepas comparadas (*B. thuringiensis* BMB171, *B. cereus* Q1 y *B. bombysepticus* Wang), considerado un alto porcentaje en comparación con otros grupos de bacterias (Liu *et al.*, 2013b; Loper *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos estudios han evidenciado, dentro del grupo *B. cereus*, diferencias en el orden de genes, reordenamientos cromosómicos, variaciones nucleotídicas, y mutaciones, entre otros. (Patiño-Navarrete y Sanchis, 2017; Rasko *et al.*, 2005). Estas diferencias pueden estar basadas solo en unos cuantos genes. En *B25*, esta lista integra genes relacionados con reguladores de transcripción, proteínas de membrana, motilidad y genes implicados con actividad de las enzimas líticas, junto con elementos integrativos y conjugativos, transposones, resistencia a múltiples fármacos y algunos genes relacionados con fagos (Juhas *et al.*, 2009). Estos genes están ubicados, en su mayoría, en islas genómicas (GI) (Cap. 2, Tabla S4), cuya lista en *B25*, se asocian con la transferencia horizontal de genes, que a su vez se relaciona con la adquisición de rasgos adaptativos que pueden ser beneficiosos bajo ciertas condiciones ambientales o de crecimiento (Böhm *et al.*, 2015; Schmidt y Hensel 2004). De esa misma lista de genes específicos en *B25*,

se encuentran tres elementos CRISPR, considerado un mecanismo de defensa único contra el ADN extraño y en las respuestas al estrés bacteriano y la virulencia (Louwen *et al.*, 2014, Marraffini, 2015), y, el hecho de que las otras cepas no contengan este sistema, sugiere que *B25* podría representar un sub-linaje filogenético separado dentro del grupo *B. cereus*.

En este trabajo, se logró identificar genes que, basados en trabajos previos, están posiblemente implicados en el control que *B25* ejerce sobre *Fv*. Se identificaron genes para la producción de enzimas líticas, sideróforos, antibióticos y producción de biopelículas. Esta información también fue comparada con cepas del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*, estando, en su mayoría, ampliamente conservados.

B25 posee genes que codifican para quitinasas, quitosanasas y glucanasas que en estudios previos, han mostrado eficacia en el control biológico de hongos fitopatógenos (Downing *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2016). Los sobrenadantes de *B25* en interacción con *Fv*, durante las primeras 6 h de interacción directa e indirecta (membrana), influyeron en el retraso de la germinación de esporas del hongo (Cap. 3, Tabla 1, Figura 3), por lo que posiblemente *B25* respondió ante la presencia de P03, produciendo determinados compuestos antifúngicos. Dados los reportes previos sobre compuestos que degradan estructuras celulares fúngicas (esporas, hifas y pared celular), este hecho se le puede atribuir a la presencia en los sobrenadantes de enzimas líticas como quitinasas, quitosanasas y glucanasas (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). En el análisis transcriptómico realizado en este trabajo, no fue posible identificar la expresión diferencial de enzimas líticas en *B25* a las 6 h de interacción con *Fv*, respecto a la condición control (*B25* sin interactuar con P03). Sin embargo, Figueroa-López *et al.*, (2017) observaron que los niveles de transcripción de los genes de quitinasas en *B25* se inducen en respuesta a la adición de lisados fúngicos de *Fv* y quitina, pero en un tiempo más prolongado de interacción (después de 24 h), confirmando el potencial de las quitinasas para controlar a este patógeno fúngico.

En este mismo sentido, *B25* posee los genes necesarios para la producción del antibiótico surfactina (operón *SrfAABCD*) y se ha reportado como un mecanismo clave de biocontrol en *B. amyloliquefaciens* SQR9 y *B. subtilis* SG6 (Li *et al.*, 2014, Zhao *et al.*, 2014). Por lo que la inhibición de la germinación de esporas también podría atribuirse a las surfactinas que *B25* es capaz de producir cuando se encuentra en interacción con P03, ya que en trabajos previos se ha identificado a este compuesto, junto con lipopéptidos cíclicos como iturinas y fengicinas, los cuales actúan incrementando la permeabilidad en la membrana lipídica de las esporas de hongos fitopatógenos, después de cinco días de interacción, provocando la pérdida de macromoléculas esenciales e induciendo daño micelial (Chitarra *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). Sin embargo, no se observó la expresión diferencial de surfactinas en *B25* al interactuar con *Fv*, durante las primeras 6 h. Es por esto que es importante analizar muestras tomadas en tiempos más prolongados de interacción, ya que posiblemente se identifique la expresión de más genes implicados con actividad de enzimas líticas y surfactinas.

Por otro lado, en la muestra de *B25* proveniente del tratamiento de interacción por membrana se observó la sobreexpresión de tres genes implicados en la biosíntesis de sideróforos y transporte activo de hierro (Cap. 3, Tabla 2) y una tendencia a la sobreexpresión de dos genes implicados en la captación de hierro en muestras de interacción directa de *B25* con *Fv*. Los sideróforos, como la bacilibactina, desempeñan un papel clave para el antagonismo y se han descrito en varias especies (Chu *et al.*, 2010), incluido *B. amyloliquefaciens* SQR9 (Li *et al.*, 2014). El sideróforo petrobactina también se ha considerado vital para la adquisición de hierro y la virulencia en *B. anthracis* (Lee *et al.*, 2011). Investigaciones recientes han reportado los efectos inhibitorios de sideróforos producidos por *Pseudomonas syringae* en la germinación de esporas de *F. oxysporum* (Yu *et al.*, 2017), mientras que Li *et al.* (2014) identificaron la respuesta inhibitoria específica del sideróforo bacilibactina en contra del desarrollo de la misma especie de *Fusarium*. De acuerdo a lo observado en el presente estudio, los sideróforos producidos por *B25* podrían estar implicados en la respuesta

temprana (durante las primeras 6 h de interacción) de la bacteria ante la presencia de *Fv*.

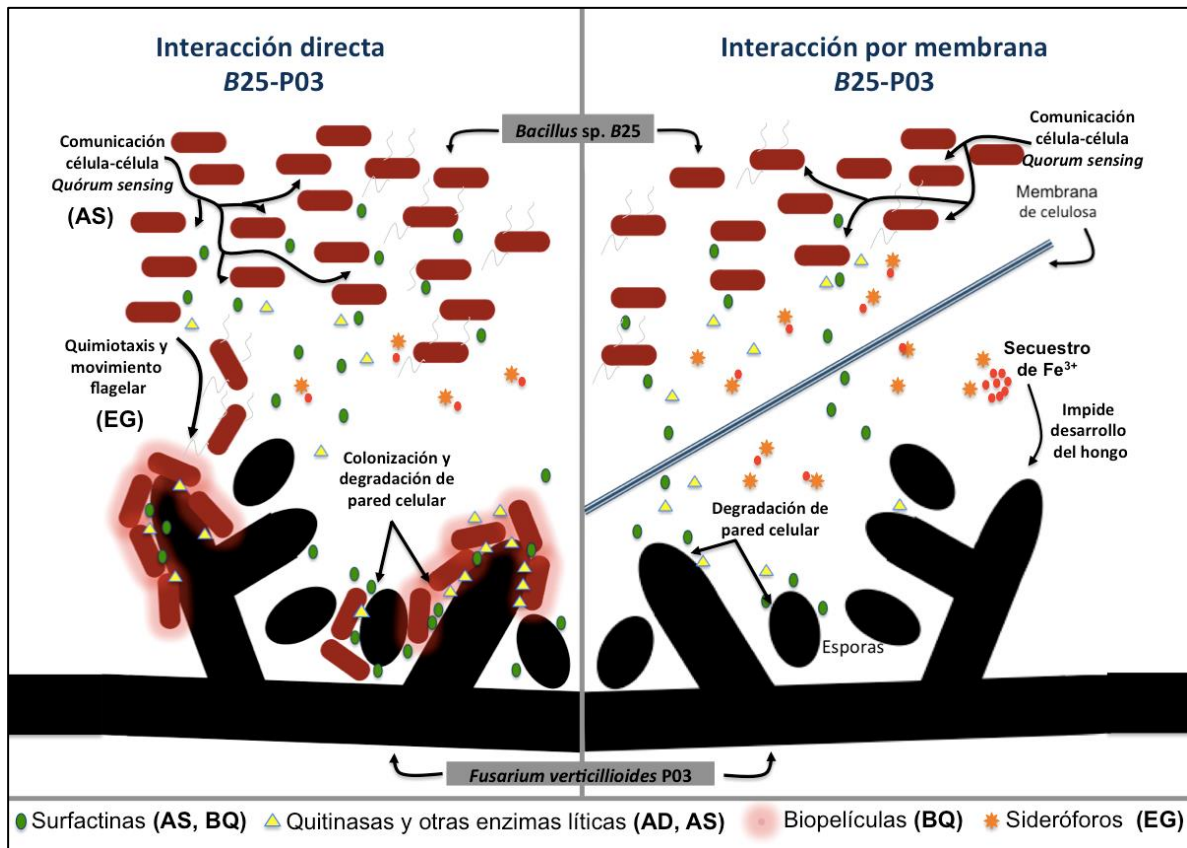


Figura 5. Representación de la respuesta de B25 a la presencia de hifas y/o esporas de *Fv* P03. La interacción de *B25*-P03 analizada en este trabajo fue directa (izquierda) y a través de una membrana de celulosa (derecha). El modelo de la actividad de los compuestos antifúngicos de *B25* se basó en diversas evidencias: antecedentes de actividad en otros sistemas biológicos (AS); evidencias bioquímicas (BQ) y genéticas (EG) derivadas del análisis de RNA-seq presentadas en este trabajo y antecedentes directos de actividad de quitinasas en *B25* (AD) reportados por Figueroa-López *et al.*, (2017). Los genes codificantes para todos los mecanismos planteados se encuentran en el genoma de *B25*.

La formación de biopelículas es el primer paso de las bacterias endofíticas para colonizar las raíces (Gao *et al.*, 2015) y puede ayudar a proteger a las plantas frente a factores ambientales (Hall-Stoodley *et al.*, 2004) así como a

enfermedades (Bais, 2004; Chen *et al.*, 2013). Este es un mecanismo encontrado en el genoma de *B25* (operón sipW-tasA, con reguladores sinR y sinI) y podría ser determinante para los mecanismos de biocontrol de *Fv*, mediante comunicación célula-célula a través del mecanismo de *quorum sensing* y producción de metabolitos antifúngicos (Danhorn y Fuqua, 2007). Sin embargo, no se encontró evidencia de expresión de genes relacionados con este sistema. Era de esperarse que los genes implicados en este mecanismo no tuvieran cambio de expresión durante la interacción de *B25* con *Fv*, ya que uno de los factores estimulantes para la formación de biopelículas es la interacción con exudados de raíces de plantas (Pandín *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2016). Sin embargo, también se conoce su acción durante la interacción directa de bacterias benéficas con hifas de hongos fitopatógenos (Matteoli *et al.*, 2018), por lo que es necesaria una mejora en el manejo de datos de RNA-seq de las muestras de interacción directa entre *B25* y P03. Aunque los componentes de este mecanismo de producción de biopelículas están completos en *B25*, el entendimiento de su funcionamiento deberá ser estudiado más profundamente para poder utilizarlo en el diseño de estrategias aplicables al control biológico de enfermedades en campo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un modelo (Figura 5) acerca de la actividad de los compuestos antifúngicos, identificados primeramente a nivel genómico en *B25* (Cap. 2, Figura S5, Tabla 2), durante su interacción (directa o indirecta) con *Fv* P03. El mecanismo de *quorum sensing*, que permite la comunicación bacteriana ante estímulos del ambiente, permite sentir la presencia del hongo bajo cualquiera de las dos condiciones analizadas en este estudio, para posteriormente producir los compuestos correspondientes a cada condición. Las evidencias genéticas derivadas del análisis de RNA-seq nos permiten inferir y proponer al mecanismo de taxis y movimiento flagelar (Cap. 3, Tabla 4) de *B25*, como los encargados de sentir la presencia del P03 y dirigir a la bacteria hacia las hifas y esporas del mismo durante su interacción directa, para posteriormente adherirse y colonizar estas estructuras mediante la producción de biopelículas. Derivado de estos mismos datos, se propone la actividad de sideróforos en *B25* durante interacción por membrana (indirecta) con P03 y,

aunque los datos transcriptómicos no lo muestren, es posible que este mismo mecanismo se encienda en B25 durante su interacción directa con el hongo. De acuerdo a las evidencias de la actividad de los compuestos bioactivos en los sobrenadantes de B25 (Cap. 3, Figura 3), se sugiere que, una vez que la bacteria se establece sobre las hifas del hongo al interactuar directamente, es posible que secreta directamente sobre estas las surfactinas y enzimas líticas que B25 es capaz de producir para degradar la pared celular fúngica. Esto se sustenta con el antecedente de la eficacia de las quitinasas producidas por B25 para el control de *Fv* P03 (Figuroa-López *et al.*, 2017). Así mismo, posiblemente B25 produzca surfactinas y enzimas líticas al sensor a P03 incluso al interactuar a través de la membrana, aunque el daño provocado al hongo sea menor, de acuerdo a lo observado en el efecto del sobrenadante de la muestra BPM sobre la germinación de esporas de P03 (Cap. 3, Figura 3).

Aunque es necesario estudios más profundos sobre la funcionalidad de muchos de los genes identificados en B25, este trabajo aporta información de gran utilidad en cuanto a la capacidad de este organismo para antagonizar hongos fitopatógenos. Esta información será de gran utilidad en futuras investigaciones, cuya finalidad sea aumentar la sustentabilidad de la actividad agrícola mediante el manejo de enfermedades con agentes de biocontrol como la bacteria B25.

CONCLUSIONES GENERALES

Bacillus sp. cepa *B25* contiene los genes necesarios para controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos, incluyendo genes que codifican para sistemas de competencia por nutrientes, micoparasitismo, antibiosis y formación de biopelículas.

El genoma de *Bacillus* sp. cepa *B25* contiene genes específicos no presentes en otras cepas filogenéticamente cercanas implicados principalmente en la producción de enzimas líticas, reguladores transcripcionales, transportadores, proteínas de membrana.

Evidencias genéticas y bioquímicas presentadas en este trabajo, así como antecedentes de la actividad antifúngica de *B25*, permiten proponer que los mecanismos de actividad de sideróforos, enzimas líticas y de producción del antibiótico surfactina, juegan un papel fundamental en el biocontrol de *Fv* P03, ya sea en interacción directa o a través de una membrana de celulosa (interacción indirecta).

Estas mismas evidencias sugieren que los mecanismos de quimiotaxis y movimiento flagelar, así como la producción de biopelículas se inducen en la interacción directa de *B25*-P03.

ANEXO

Archivos que contienen la relación de genes producto de la secuenciación del genoma de *Bacillus* sp. B25

Dataset 1: List of B25 genes and the functional roles assigned by the RAST and list of genes whose functional roles were not assigned by the RAST server.

[ANEXOS\Dataset_S1.xls](#)

Dataset 2: Details of the functional roles of RAST annotated genes of four compared *Bacillus* spp. genomes. The numbers of genes grouped in each subsystem feature category for each strain is shown in the summary page and correspond to Figure S4.

[ANEXOS\Dataset_S2.xls](#)

Dataset 3: List of shared genes between strains of the *Bacillus cereus* group and specific genes for each strain.

[ANEXOS\Dataset_S3.xls](#)

LITERATURA CITADA

- Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150(Pt 7): 2029-2035. doi: 10.1099/mic.0.26980-0.
- Agaisse, H., and Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177(21): 6072-6032.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31(2):166-169. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., 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(1): 75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- Bais, H.P. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134(1): 307-319. doi: 10.1104/pp.103.028712.
- Batool, M., Khalid, M.H., Hassan, M.N., and Hafeez, F.Y. 2011. Homology modeling of an antifungal metabolite plipastatin synthase from the *Bacillus subtilis* 168. *Bioinformation* 7(8): 384-387.
- Baysal, Ö., Çalışkan, M., and Yeşilova, Ö. 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73(1-3): 25-32. doi: 10.1016/j.pmpp.2008.11.002.
- Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M.J., Liles, M.R., and Figueras, M.J. 2015. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic

affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. Plos One 10(1): e0115813. doi: 10.1371/journal.pone.0115813.

Ben Abdallah, D., Frikha-Gargouri, O., and Tounsi, S. 2018. Rizhospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. Biol. Control. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.01.013>.

Ben Abdallah, R.A., Mokni-Tlili, S., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., and Daami-Remadi, M. 2016. Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. Biol. Control 97: 80-88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.005>.

Berg, G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 84(11). doi: 10.1007/s00253-009-2092-7.

Bertelli, C., Laird, M.R., Williams, K.P., Lau, B.Y., Hoad, G., Winsor, G.L., and Brinkman, F.S.L. 2017. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. Nucleic Acids Res. 45(Web server issue): W30–W35. doi: 10.1093/nar/gkx343.

Binnewies, T.T., Motro, Y., Hallin, P.F., Lund, O., Dunn, D., La, T., Hampson, D.J., Bellgard, M., Wassenaar, T.M., and Ussery, D.W. 2006. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. Func. Integ. Genomics 6(3): 165-185. doi: 10.1007/s10142-006-0027-2.

Blom, J., Albaum, S.P., Doppmeier, D., Puhler, A., Vorholter, F.J., Zakrzewski, M., and Goesmann, A. 2009. EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. BMC Bioinform. 10: 154. doi: 10.1186/1471-2105-10-154.

Boetzer, M., Henkel, C.V., Jansen, H.J., Butler, D., and Pirovano, W. 2011. Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. Bioinformatics 27(4): 578-579.

- Boetzer, M., and Pirovano, W. 2012. Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biol.* 13: R16.
- Böhm, M.-E., Huptas, C., Krey, V.M., and Scherer, S. 2015. Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evolutionary Biology* 15: 246. doi: 10.1186/s12862-015-0529-4.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bouizgarne, B. 2012. Bacteria for plant growth promotion and disease management. *In* *Agrobiology: Disease management. Edited by D. Maheshwari*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 15-47.
- Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., and Ongena, M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microb. Biotechnol.* 8(2): 281-295. doi: 10.1111/1751-7915.12238.
- Chang, W.-T., Chen, M.-L., and Wang, S.-L. 2010. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J. Microb. and Biot.* 26(5): 945-950. doi: 10.1007/s11274-009-0244-7.
- Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., Piel, J., and Borriss, R. 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J. Biotechnol.* 140(1-2): 27-37.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., and Guo, J. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 15(3): 848-864. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.

- Cheng, T., Lin, P., Jin, S., Wu, Y., Fu, B., Long, R., Liu, D., Guo, Y., Peng, L., and Xia, Q. 2014. Complete genome sequence of *Bacillus bombysepticus*, a pathogen leading to *Bombyx mori* black chest septicemia. *Genome Announc.* 2(3): e00312-00314. doi: 10.1128/genomeA.00312-14.
- Chu, B.C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T.H., Krewulak, K.D., Lau, C.K., and Peacock, R.S. 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601–611.
- Cook, R.J. 1993. Making greater use of Introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31(1): 53-80. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.000413.
- Cordero-Ramírez, J.D. 2013. Creación e identificación molecular de un banco de germoplasma de microorganismos de la rizósfera de maíz para el escrutinio de antagonistas a *Fusarium* sp. . *In* *Biotecnología Agrícola*. Instituto Politécnico Nacional, Sinaloa, México.
- Danhorn, T., and Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 401–422.
- Daniel, R.A., Haiech, J., Denizot, F., and Errington, J. 1997. Isolation and characterization of the *lacA* gene encoding β -galactosidase in *Bacillus subtilis* and a regulator gene, *lacR*. *J. Bacteriol.* 179(17): 5636-5638.
- Darling, A.E., Mau, B., and Perna, N.T. 2010. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5(6): e11147. doi: 10.1371/journal.pone.0011147.
- Dell' Amico, E., Cavalca, L., and Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52(2): 153-162. doi: 10.1016/j.femsec.2004.11.005.

- Douriet-Gámez, N.R., Maldonado-Mendoza, I.E., Ibarra-Laclette, E., Blom, J., and Calderón-Vázquez, C.L. 2018. Genomic analysis of *Bacillus* sp. strain B25, a biocontrol agent of maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Curr. Microbiol.* 75(3): 247-255. doi: 10.1007/s00284-017-1372-1.
- Dowling, D.N., and O'Gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12(4): 133-141. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90091-4).
- Downing, K.J., Leslie, G., and Thomson, J.A. 2000. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA genes in sugarcane-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2808-2810.
- Duffy, B., Keel, C., and Défago, G. 2004. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(3): 1836-1842.
- Dunlap, C.A., Schisler, D.A., Bowman, M.J., and Rooney, A.P. 2015. Genomic analysis of *Bacillus subtilis* OH 131.1 and co-culturing with *Cryptococcus flavescens* for control of *Fusarium* head blight. *Plant Gene* 2: 1-9. doi: 10.1016/j.plgene.2015.03.002.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5): 1792-1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Faraldo-Gómez, J.D., and Sansom, M.S.P. 2003. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 105. doi: 10.1038/nrm1015.
- Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., and Zhang, Y. 2006. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. *In* PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Edited by Z.A. Siddiqui. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 67-109.

- Figuerola-López, A.M., Cordero-Ramírez, J.D., Martínez-Álvarez, J.C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G.J., Félix-Gastélum, R., Castro-Martínez, C., and Maldonado-Mendoza, I.E. 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. SpringerPlus 5(1). doi: 10.1186/s40064-016-1780-x.
- Figuerola-López, A.M., Leyva-Madrigal, K.Y., Cervantes-Gámez, R.G., Beltrán-Arredondo, L.I., Douriet-Gámez, N.D., Castro-Martínez, C., and Maldonado-Mendoza, I.E. 2017. Induction of *Bacillus cereus* chitinases as a response to lysates of *Fusarium verticillioides*. Rom. Biotechnol. Lett. 22(4).
- Frankowski, J., Lorito, M., Scala, F., Schmid, R., Berg, G., and Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. Arch. Microbiol. 176(6): 421-426. doi: 10.1007/s002030100347.
- Fravel, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26(1): 75-91. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.000451.
- Gaballa, A., Abeysinghe, P.D., Urich, G., Matthijs, S., De Greve, H., Cornelis, P., and Koedam, N. 1997. Trehalose induces antagonism towards *Pythium debaryanum* in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. Appl. Environ. Microbiol. 63(11): 4340-4345.
- Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C.R., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M.A., Rayo, E., Isauro, D., and Jurado, C. 2013. The challenges of introducing a new biofungicide to the market: A case study. Electron. J. Biotechnol. 16: 5-5.
- Gao, T., Foulston, L., Chai, Y., Wang, Q., and Losick, R. 2015. Alternative modes of biofilm formation by plant-associated *Bacillus cereus*. Microbiologyopen 4(3): 452-464. doi: 10.1002/mbo3.251.
- Gao, X.-A., Ju, W.-T., Jung, W.-J., and Park, R.-D. 2008. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus cereus* D-11. Carbohydr. Polym. 72: 513–520.

- Garbeva, P., van Elsas, J.D., and de Boer, W. 2012. Draft genome sequence of the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* strain PRI-2C. *J. Bacteriol.* 194(15): 4119-4120. doi: 10.1128/jb.00679-12.
- Gerhardson, B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnol.* 20(8): 338-343. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02021-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02021-8).
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41(2): 109-117. doi: 10.1139/m95-015.
- Gohar, M., Gilois, N., Graveline, R., Garreau, C., Sanchis, V., and Lereclus, D. 2005. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* 5(14): 3696-3711. doi: 10.1002/pmic.200401225.
- Gray, E.J., and Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37(3): 395-412. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>.
- Grissa, I., Vergnaud, G., and Pourcel, C. 2007. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* 35(Web server issue): W52–W57. doi: 10.1093/nar/gkm360.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R., and Konradsen, F. 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC Public Health* 7(357): 15. doi: 10.1186/1471-2458-7-357.
- Guo, Q., Li, S., Lu, X., Zhang, X., Wang, P., and Ma, P. 2014. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* BAB-1, a biocontrol agent for suppression of tomato gray mold. *Genome Announc.* 2(4): e00744-00714. doi: 10.1128/genomeA.00744-14.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2): 95-108.

- He, J., Shao, X., Zheng, H., Li, M., Wang, J., Zhang, Q., Li, L., Liu, Z., Sun, M., Wang, S., and Yu, Z. 2010. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. *J. Bacteriol.* 192(15): 4074-4075. doi: 10.1128/jb.00562-10.
- Helistö, P., Aktuganov, G., Galimzianova, N., Melentjev, A., and Korpela, T. 2001. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: isolation and purification of components. *J. Chromatogr. B.* 758: 197-2005.
- Hennessy, R.C., Glaring, M.A., Olsson, S., and Stougaard, P. 2017. Transcriptomic profiling of microbe–microbe interactions reveals the specific response of the biocontrol strain *P. fluorescens* In5 to the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *BMC Res. Notes* 10(1): 376. doi: 10.1186/s13104-017-2704-8.
- Hernández-Salmerón, J.E., Hernández-León, R., Orozco-Mosqueda, M.D.C., Valencia-Cantero, E., Moreno-Hagelsieb, G., and Santoyo, G. 2016. Draft genome sequence of the biocontrol and plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* strain UM270. *Stand. in Genomic Sci.* 11(1): 5. doi: 10.1186/s40793-015-0123-9.
- Höfte, H., and Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53(2): 242-255.
- Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A.M., Diaz Valerio, S.M., Poehlein, A., Brzuszkiewicz, E.B., Neemann, K., Braus-Stromeier, S.A., Braus, G.H., Daniel, R., and Liesegang, H. 2017. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* Inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. *Front. Microbiol.* 7(2171). doi: 10.3389/fmicb.2016.02171.
- Huang, L., Cheng, T., Xu, P., Cheng, D., Fang, T., and Xia, Q. 2009. A genome-wide survey for host response of silkworm, *Bombyx mori* during pathogen *Bacillus bombysepticus* infection. *PLoS ONE* 4(12): e8098. doi: 10.1371/journal.pone.0008098.

- Islam, M.T., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T., and Tahara, S. 2005. Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne *Peronosporomycetes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(7): 3786–3796. doi: 10.1128/AEM.71.7.3786-3796.2005.
- Ji, S.H., Paul, N.C., Deng, J.X., Kim, Y.S., Yun, B.S., and Yu, S.H. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Microbiology* 41(4): 234-242.
- Jia, Z., Jin, W., Huang, Y., and Song, S. 2017. Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* J-5, a potential biocontrol agent. *Genome Announc.* 5(23): e00275-00217. doi: 10.1128/genomeA.00275-17.
- Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *Fems Microbiol. Rev.* 33(2): 376–393. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
- Kleijn, L.H.J., and Martin, N.I. 2017. The cyclic lipopeptide antibiotics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 1-27.
- Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Seidl-Seiboth, V., Martinez, D.A., Druzhinina, I.S., Thon, M., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Horwitz, B.A., Mukherjee, P.K., Mukherjee, M., Kredics, L., Alcaraz, L.D., Aerts, A., Antal, Z., Atanasova, L., Cervantes-Badillo, M.G., Challacombe, J., Chertkov, O., McCluskey, K., Coulpier, F., Deshpande, N., von Döhren, H., Ebbole, D.J., Esquivel-Naranjo, E.U., Fekete, E., Flipphi, M., Glaser, F., Gómez-Rodríguez, E.Y., Gruber, S., Han, C., Henrissat, B., Hermosa, R., Hernández-Oñate, M., Karaffa, L., Kostı, I., Le Crom, S., Lindquist, E., Lucas, S., Lübeck, M., Lübeck, P.S., Margeot, A., Metz, B., Misra, M., Nevalainen, H., Omann, M., Packer, N., Perrone, G., Uresti-Rivera, E.E., Salamov, A., Schmoll, M., Seiboth, B., Shapiro, H., Sukno, S., Tamayo-Ramos, J.A., Tisch, D., Wiest, A., Wilkinson, H.H., Zhang, M., Coutinho, P.M., Kenerley, C.M., Monte, E., Baker, S.E., and Grigoriev, I.V. 2011. Comparative genome sequence analysis

underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol.* 12(4): R40-R40. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r40.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.-K., Codani, J.-J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.-Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.-F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.-M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauel, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.-H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.-S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., and Danchin, A. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390(6657): 249-256.

- Langmead, B., and Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9: 357. doi: 10.1038/nmeth.1923 <https://www.nature.com/articles/nmeth.1923> - supplementary-information.
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M.L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebretiere, M.-H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Sorokin, A. 2008. Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 171(2): 236-249. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.03.003>.
- Larralde-Corona, C.P., del Socorro Ramírez-González, M., Pérez-Sánchez, G., Oliva-Hernández, A.A., and Narváez-Zapata, J.A. 2011. Identification of differentially expressed genes in the citrus epiphytic-yeast *Pichia guilliermondii* during interaction with *Penicillium digitatum*. *Biol. Control* 57(3): 208-214. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.02.012>.
- Lee, D.-H., Kim, H.R., Chung, H.Y., Lim, J.G., Kim, S., Kim, S.K., Ku, H.-J., Kim, H., Ryu, S., Choi, S.H., and Lee, J.-H. 2015. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* FORC_005, a food-borne pathogen from the soy sauce braised fish-cake with quail-egg. *Stand. Genomic. Sci.* 10(97).
- Lee, J.Y., Passalacqua, K.D., Hanna, P.C., and Sherman, D.H. 2011. Regulation of petrobactin and bacillibactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* under iron and oxygen variation. *PLoS ONE* 6(6): e20777. doi: 10.1371/journal.pone.0020777.
- Lee, K.-J., Oh, B.-T., and Seralathan, K.-K. 2013a. Advances in plant growth promoting rhizobacteria for biological control of plant diseases. *In* *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management*. Edited by D.K. Maheshwari. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 1-13.
- Lee, K.J., Oh, B.T., and Seralathan, K.K. 2013b. Advances in plant growth promoting rhizobacteria for biological control of plant diseases. 1-13. doi: 10.1007/978-3-642-33639-3_1.

- Lee, Y.S., Kim, B.Y., Ahn, J.H., Song, J., Seol, Y.J., Kim, W.G., and Weon, H.Y. 2012. Draft genome sequence of the biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain M27. *J. Bacteriol.* 194(24): 6934-6935.
- Lefort, F., Calmin, G., Pelleteret, P., Farinelli, L., Osteras, M., and Crovadore, J. 2014. Whole-genome shotgun sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* strain UASWS BA1, a bacterium antagonistic to plant pathogenic fungi. *Genome Announc.* 2(1): e00016-00014. doi: doi:10.1128/genomeA.00016-14
- Leyva-Madriral, K.Y., Larralde-Corona Claudia, P., Apodaca-Sánchez Miguel, A., Quiroz-Figueroa Francisco, R., Mexia-Bolaños Priscila, A., Portillo-Valenzuela, S., Ordaz-Ochoa, J., and Maldonado-Mendoza Ignacio, E. 2014. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in northern Sinaloa, Mexico. *J. Phytopathol.* 163(6): 486-497. doi: 10.1111/jph.12346.
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., and Zhang, R. 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00636.
- Li, L., Stoeckert, C.J., and Roos, D.-S. 2003. OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 13(9): 2178-2189.
- Li, P., Kwok, A.H.Y., Jiang, J.W., Ran, T., Xu, D., Wang, W., and Leung, F.C. 2015. Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. *PLoS ONE* 10(4): e0123061. doi: 10.1371/journal.pone.0123061.
- Liu, D.e.a. 2009. Chitinase B from *Bacillus thuringiensis* enhancing potential and its antagonism and insecticidal. *Acta Microbiol. Sin.* 49: 180–185.

- Liu, G., Song, L., Shu, C., Wang, P., Deng, C., Peng, Q., Lereclus, D., Wang, X., Huang, D., Zhang, J., and Song, F. 2013a. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. *Genome Announc.* 1(2): e00080-00013.
- Liu, W.Y., Wong, C.F., Chung, K.M.K., Jiang, J.W., and Leung, F.C. 2013b. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS ONE* 8(9): e74487. doi: 10.1371/journal.pone.0074487.
- Liu, Y., Tao, J., Yan, Y., Li, B., Li, H., and Li, C. 2011. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chin. J. Chem. Eng.* 21: 288-293.
- Lizárraga-Sánchez, G.J., Leyva-Madrigal, K.Y., Sánchez-Peña, P., Quiroz-Figueroa, F.R., and Maldonado-Mendoza, I.E. 2015. *Bacillus cereus sensu lato* strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. *Field Crops Res.* 176: 11-21. doi: 10.1016/j.fcr.2015.02.015.
- Loper, J.C., and Henkels, M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5357-5363.
- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Davis, E.W., Lim, C.K., Shaffer, B.T., Elbourne, L.D.H., Stockwell, V.O., Hartney, S.L., Breakwell, K., Henkels, M.D., Tetu, S.G., Rangel, L.I., Kidarsa, T.A., Wilson, N.L., van de Mortel, J.E., Song, C., Blumhagen, R., Radune, D., Hostetler, J.B., Brinkac, L.M., Durkin, A.S., Kluepfel, D.A., Wechter, W.P., Anderson, A.J., Kim, Y.C., Pierson, L.S., Pierson, E.A., Lindow, S.E., Kobayashi, D.Y., Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., Thomashow, L.S., Allen, A.E., and Paulsen, I.T. 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet.* 8(7): e1002784. doi: 10.1371/journal.pgen.1002784.

- Louwen, R., Staals, R.H.J., Endtz, H.P., van Baarlen, P., and van der Oost, J. 2014. The Role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78(1): 74-88. doi: 10.1128/MMBR.00039-13.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15(12): 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63(1): 541-556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918.
- Lyons, E., and Freeling, M. 2008. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. *Plant J.* 53: 661–673.
- Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., and Ptak, M. 1992. Surfactin iturinA interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74: 1047-1051.
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L.Y., and Bryant, S.H. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45(Database issue): D200-D203.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X.V., Goodwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., and Rothberg, J.M. 2005. Genome

Sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature* 437(7057): 376-380. doi: 10.1038/nature03959.

Marraffini, L.A. 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* 526(7571): 55–61. doi: doi:10.1038/nature15386.

Martínez-Absalón, S., Rojas-Solís, D., Hernández-León, R., Prieto-Barajas, C., Orozco-Mosqueda, M.C., Peña-Cabriales, J.J., Sakuda, S., Valencia-Cantero, E., and Santoyo, G. 2014. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the grey mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Sci. Techn.* 24(12): 1349-1362. doi: 10.1080/09583157.2014.940846.

Martínez-Álvarez, J.C., Castro-Martínez, C., Sánchez-Peña, P., Gutiérrez-Dorado, R., and Maldonado-Mendoza, I.E. 2016. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus sensu lato* strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32(5): 75. doi: 10.1007/s11274-015-2000-5.

Massart, S., and Jijakli, H.M. 2007. Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *J. of Microbiol. Methods* 69(2): 229-241. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.09.010>.

Matilla, M.A., and Krell, T. 2018. Plant growth promotion and biocontrol mediated by plant-associated bacteria. *In Plant Microbiome: Stress Response. Edited by D. Egamberdieva and P. Ahmad.* Springer Singapore, Singapore. pp. 45-80.

Matillaa , M.A., Udaondoc, Z., Krellb, T., and Salmonda, G.P.C. 2017. Genome sequence of *Serratia marcescens* MSU97, a plant-associated bacterium that makes multiple nntibiotics. *Genome Announc.* 5(9): e01752-01716. doi: 10.1128/genomeA.01752-16.

Matsuda, Y., Iida, Y., Shinogi, T., Kakutani, K., Nonomura, T., and Toyoda, H. 2001. In vitro suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular

chitosanase of *Sphingobacterium multivorum* and cloning of the chitosanase gene csnSM1. J. Gen. Plant Pathol. 67: 318–324.

Matteoli, F.P., Passarelli-Araujo, H., Reis, R.J.A., da Rocha, L.O., Souza, E.M., Aravind, L., Olivares, F.L., and Venancio, T.M. 2018. Genome sequencing and assessment of plant growth-promoting properties of a *Serratia marcescens* strain isolated from vermicompost. bioRxiv.

Medema, M.H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M.A., Weber, T., Takano, E., and Breitling, R. 2011. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. Nucleic Acids Res. 39(suppl): W339-W346. doi: 10.1093/nar/gkr466.

Mittal, P., Kamle, M., Sharma, S., Choudhary, P., Pratap Rao, D., and Kumar, P. 2017. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Mechanism, role in crop improvement and sustainable agriculture.

Mora, I., Cabrefiga, J., and Montesinos, E. 2015. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated bacillus against phytopathogenic bacteria. PLoS ONE 10(5): e0127738. doi: 10.1371/journal.pone.0127738.

Mulé, G., Susca, A., Stea, G., and Moretti, A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for the identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. Eur. J. Plant. Pathol. 110: 495–502.

Narayanasamy, P. 2013. Mechanisms of action of bacterial biological control agents. In Biological management of diseases of crops: Volume 1: Characteristics of biological control Agents. Edited by P. Narayanasamy. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 295-429.

Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 270(45): 26723–26726. doi: 10.1074/jbc.270.45.26723.

- Neupane, S. 2013. Genomics and transcriptomics of plant beneficial *Serratia* spp. *Acta Uni. Agric. Suec. Agrar.* (1652-6880) 44: 50.
- Neupane, S., Finlay, R.D., Kyrpides, N.C., Goodwin, L., Alström, S., Lucas, S., Land, M., Han, J., Lapidus, A., Cheng, J.F., Bruce, D., Pitluck, S., Peters, L., Ovchinnikova, G., Held, B., Han, C., Detter, J.C., Tapia, R., Hauser, L., Ivanova, N., Pagani, I., Woyke, T., Klenk, H.P., and Högberg, N. 2012. Complete genome sequence of the plant-associated *Serratia plymuthica* strain AS13. *Stand. Genomic Sci.* 7(1): 22-30. doi: 10.4056/sigs.2966299.
- Neupane, S., Finlay Roger, D., Alström, S., Elfstrand, M., and Högberg, N. 2014. Transcriptional responses of the bacterial antagonist *Serratia plymuthica* to the fungal phytopathogen *Rhizoctonia solani*. *Environ. Microbiol. Rep.* 7(1): 123-127. doi: 10.1111/1758-2229.12203.
- Ni, H., Zeng, S., Qin, X., Sun, X., Zhang, S., Zhao, X., Yu, Z., and Li, L. 2015. Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to improve chitinolytic, synergistic lepidopteran-larvicidal and nematicidal activities. *Int. J. Biol. Sci.* 11(3): 304-315. doi: 10.7150/ijbs.10632.
- Økstad, O.A., and Kolstø, A.-B. 2011. Genomics of *Bacillus* species. *In* *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens. Edited by M. Wiedmann and W. Zhang.* Springer New York, New York, NY. pp. 29-53.
- Ongena, M., and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16: 115-125.
- Pacheco, N., Larralde-Corona, C.P., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A., and Shirai, K. 2008. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. *Int. J. of Biol. Macromol.* 43(1): 20-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.10.009>.
- Pal, K.K., and McSpadden, G.B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor.* doi: DOI:10.1094/PHI-A-2006-1117-02.

- Pandin, C., Le Coq, D., Canette, A., Aymerich, S., and Briandet, R. 2017. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? *Microb. Biotechnol.* 10(4): 719-734. doi: 10.1111/1751-7915.12693.
- Patiño-Navarrete, R., and Sanchis, V. 2017. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Res. Microbiol.* 168(4): 309-318. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.002>.
- Perazzolli, M., Herrero, N., Sterck, L., Lenzi, L., Pellegrini, A., Puopolo, G., Van de Peer, Y., and Pertot, I. 2016. Transcriptomic responses of a simplified soil microcosm to a plant pathogen and its biocontrol agent reveal a complex reaction to harsh habitat. *BMC Genomics* 17: 838. doi: 10.1186/s12864-016-3174-4.
- Pereira, P., Nesci, A., Castillo, C., and Etcheverry, M. 2010. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. *Biol. Control* 53(3): 258-266. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.001>.
- Pérez-García, A., Romero, D., and de Vicente, A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22(2): 187-193. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>.
- Polonio, Á., Vida, C., De Vicente, A., and Cazorla, F.M. 2017. Impact of motility and chemotaxis features of the rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 on its biocontrol of avocado white root rot. *Int. Microbiol.* 20(2): 95-104.
- Priest, F.G., Barker, M., Baillie, L.W.J., Holmes, E.C., and Maiden, M.C.J. 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 186(23): 7959-7970. doi: 10.1128/jb.186.23.7959-7970.2004.

- Puopolo, G., Tomada, S., and Pertot, I. 2017. The impact of the omics era on the knowledge and use of *Lysobacter* species to control phytopathogenic microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* 124(1): 15-27. doi: 10.1111/jam.13607.
- Quintero Benítez, J.A., and Apodaca Sánchez, M.A. 2008. Las pudriciones de tallos en el maíz y su manejo en Sinaloa. I Curso sobre Manejo Sustentable del Maíz; Resultados de Investigación en el Norte de Sinaloa., Universidad Autónoma de Sinaloa. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Juan José Ríos, Sinaloa. México.
- Rahman, M.M., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Suzuki, K., Dey, T.K., Nonaka, M., and Harada, N. 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. *Australasian Plant Pathol.* 45(1): 103–117. doi: 10.1007/s13313-016-0397-4.
- Rasko, A., Altherr, M.R., Han, C.S., and Ravel, J. 2005. Genomics of the *Bacillus* group or organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(1): 303–329. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.005.
- Reiter, L., Tourasse, N.J., Fouet, A., Loll, R., Davison, S., Okstad, O.A., Piehler, A.P., and Kolsto, A.B. 2011. Evolutionary history and functional characterization of three large genes involved in sporulation in *Bacillus cereus* group bacteria. *J. Bacteriol.* 193(19): 5420-5430. doi: 10.1128/jb.05309-11.
- Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P.M., and Barboza-Corona, J.E. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food Sci.* 69(5): M131-M134. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb10721.x.
- Robison, H.L., Schwartz, C.C., Petty, J.D., and Brussard, P.F. 2006. Assessment of pesticide residues in army cutworm moths (*Euxoa auxiliaris*) from the Greater Yellowstone Ecosystem and their potential consequences to foraging grizzly bears

(*Ursus arctos horribilis*). *Chemosphere* 64(10): 1704-1712. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.006>.

Rodriguez-R., L.M., and Konstantinidis, K.T. 2016. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Preprints* 4: e1900v1901. doi: 10.7287/peerj.preprints.1900v1.

Ron, E.Z., and Rosenberg, E. 2001. Natural role of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3(4): 229-236. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x.

Roquigny, R., Arseneault, T., Gadkar, V.J., Novinscak, A., Joly, D.L., and Fillion, M. 2015. Complete genome sequence of biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* LBUM223. *Genome Announc.* 3(3): e00443-00415. doi: 10.1128/genomeA.00443-15.

Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425.

Sanchis, V., Gohar, M., Chaufaux, J., Arantes, O., Meier, A., Agaisse, H., Cayley, J., and Lereclus, D. 1999. Development, and field performance of a broad-spectrum nonviable asporogenic recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* with greater potency and UV resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4032–4039.

Schmidt, H., and Hensel, M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(1): 14-56. doi: 10.1128/CMR.17.1.14-56.2004.

Sharma, R., Bhardwaj, R., Gautam, V., Kohli, S.K., Kaur, P., Bali, R.S., Saini, P., Thukral, A.K., Arora, S., and Vig, A.P. 2018. Microbial siderophores in metal detoxification and therapeutics: recent prospective and applications. *In Plant Microbiome: Stress Response. Edited by D. Egamberdieva and P. Ahmad.* Springer Singapore, Singapore. pp. 337-350.

Sheppard, A.E., Poehlein, A., Rosenstiel, P., Liesegang, H., and Schulenburg, H. 2013. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain 407 Cry-. *Genome Announc.* 1(1): e00158-00112.

- Sritharan, M. 2000. Iron as a candidate in virulence and pathogenesis in mycobacteria and other microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 769-780.
- St John, J. 2016. SeqPrep. Available from <https://github.com/jstjohn/SeqPrep>.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., and Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* 19(1): 1-30. doi: 10.1080/07352680091139169.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Van der Auwera, G.A., Feldgarden, M., Kolter, R., and Mahillon, J. 2013. Whole-genome sequences of 94 environmental isolates of *Bacillus cereus sensu lato*. *Genome Announc.* 1(5): e00380-00313. doi: 10.1128/genomeA.00380-13.
- Wang, X., Wang, L., Wang, J., Jin, P., Liu, H., and Zheng, Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit. *PLoS ONE* 9(11): e112494. doi: 10.1371/journal.pone.0112494.
- Wilhelm, B.T., and Landry, J.-R. 2009. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 48(3): 249-257. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.016>.
- Xiong, Z., Jiang, Y., Qi, D., Lu, H., Yang, F., Yang, J., Chen, L., Sun, L., Xu, X., Xue, Y., Zhu, Y., and Jin, Q. 2009. Complete genome sequence of the extremophilic *Bacillus cereus* strain Q1 with industrial applications. *J. Bacteriol.* 191(3): 1120-1121. doi: 10.1128/jb.01629-08.
- Xu, Y.B., Chen, M., Zhang, Y., Wang, M., Wang, Y., Huang, Q., Wang, X., and Wang, G. 2014. The phosphotransferase system gene *ptsI* in the endophytic bacterium *Bacillus cereus* is required for biofilm formation, colonization, and biocontrol

against wheat sharp eyespot. FEMS Microbiol. Lett. 354(2): 142-152. doi: 10.1111/1574-6968.12438.

Yáñez-Mendizábal, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Abadias, M., and Teixidó, N. 2012. Formulation development of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* strain CPA- 8 by spray- drying. Journal of Appl. Microbiol. 112(5): 954-965. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05258.x.

Yu, S., Teng, C., Liang, J., Song, T., Dong, L., Bai, X., Jin, Y., and Qu, J. 2017. Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. J. Microbiol. 55(11): 877-884. doi: 10.1007/s12275-017-7191-z.

Zhang, N., Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Xu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q., and Zhang, R. 2015. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. BMC Genomics 16(1): 685. doi: 10.1186/s12864-015-1825-5.

Zhao, Y., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Elodie, F.Y., and Liu, Y. 2014. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 9(3): e92486.

Zhi, Y., Wu, Q., and Xu, Y. 2017. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. Sci. Rep. 7: 40976. doi: 10.1038/srep40976

Zhou, H., Luo, C., Fang, X., Xiang, Y., Wang, X., Zhang, R., and Chen, Z. 2016. Loss of GltB inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of γ -polyglutamate and three lipopeptides. PLoS ONE 11(5): e0156247. doi: 10.1371/journal.pone.0156247.

Zhu, L., Tian, L.J., Zheng, J., Gao, Q.L., Wang, Y.Y., Peng, D.H., Ruan, L.F., and Sun, M. 2015. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar galleriae strain

HD-29, a typical strain of commercial biopesticide. *J. Biotechnol.* 195: 108-109. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.12.021.

Zuber, P., Nakano, M.M., and Marahiel, M.A. 1993. Peptide antibiotics in *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. *Am. Soc. Microb.:* 897-916.

Zwick, M.E., Joseph, S.J., Didelot, X., Chen, P.E., Bishop-Lilly, K.A., Stewart, A.C., Willner, K., Nolan, N., Lentz, S., Thomason, M.K., Sozhamannan, S., Mateczun, A.J., Du, L., and Read, T.D. 2012. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res.* 22(8): 1512-1524. doi: 10.1101/gr.134437.111.