



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE ECOLOGÍA MARINA

**DOCTORADO EN RECURSOS NATURALES Y
ECOLOGÍA**

**INTERACCIÓN DE *Bacillus licheniformis* M2-7 CONTRA
Curvularia lunata (Wakker) Boedijn CAUSANTE DE LA
MANCHA FOLIAR EN MAÍZ**

Tesis para obtener el grado de:

DOCTOR EN RECURSOS NATURALES Y ECOLOGÍA

Presenta:

M.C. Alejandro Bolaños Dircio

Directora de tesis:

Dra. Yanet Romero Ramírez

Codirector:

Dr. Víctor Rosas Guerrero

Chilpancingo de los Bravo, Gro. septiembre de 2025

AGRADICIMIENTOS

A mis padres (Agustina Dircio Martínez y Faustino Bolaños Chávez) por todo el amor, confianza y apoyo brindado durante toda la vida. Este nuevo logro, es en gran parte gracias a ustedes; he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio podría parecer tarea titánica e interminable. ¡Los quiero mucho!

A mis hermanos: Alberto, Antonio, Agustín, Andrés, Armando, José Manuel y Jorge. Les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida, sino por los grandes momentos de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado.

A la Dra. Yanet, profesora-investigadora del LMMBA y asesora de esta investigación, por su valiosa guía, atinados consejos e innumerables sugerencias, paciencia, confianza y amistad recibida.

A mis sinodales: Dr. Víctor, Dr. Sergio, Dra. Carina, y Dra. Edith quienes mejoraron el trabajo de investigación con sus acertadas aportaciones, sugerencias y correcciones.

A Lorena, Jocelyn, Yad Ciri, María, Augusto, Héctor Israel y David por ser unos grandes amigos y porque a pesar de la distancia sé que siempre podré contar con ustedes.

A América, Laura, Carlos, Jesica y Alejandro todo el apoyo, respeto y cariño que nos tuvimos dentro del laboratorio.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: BIOCONTROL DE <i>Curvularia lunata</i> EN MAÍZ CRIOLLO MEDIANTE <i>Bacillus licheniformis</i> M2-7.	5
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Material biológico y condiciones de cultivo.	7
Preparación del inóculo del patógeno.	8
Preparación del inóculo de <i>B. licheniformis</i> M2-7.	8
Diseño experimental y prueba de patogenicidad.	8
Re aislamiento y técnica de microcultivo.	8
Identificación molecular.	9
Antagonismo <i>in vitro</i>.	10
Inhibición de germinación de conidios.	10
Prueba de antagonismo <i>in vivo</i>.	10
RESULTADOS	11
<i>Curvularia lunata</i> SY17 es un fitopatógeno en plantas de maíz.	11
La cepa SY17 corresponde a <i>Curvularia lunata</i>.	12
<i>Bacillus licheniformis</i> M2-7 inhibe el crecimiento de <i>Curvularia lunata</i> SY17 en condiciones <i>in vitro</i>.	12
<i>Bacillus licheniformis</i> M2-7 inhibe la germinación de conidios de <i>Curvularia lunata</i> SY17.	13
<i>Bacillus licheniformis</i> M2-7 reduce el crecimiento de <i>Curvularia lunata</i> SY17 en hojas de maíz.	14
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	14
BIBLIOGRAFÍA	17
 Capítulo II: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL ANTAGONISMO DE <i>Bacillus licheniformis</i> M2-7 CONTRA <i>Curvularia lunata</i> SY17 CAUSANTE DE LA MANCHA FOLIAR EN MAÍZ. ...	22
RESUMEN	22
INTRODUCCIÓN	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Material biológico y condiciones de cultivo.	25

Preparación del inóculo del patógeno.	26
Preparación del inóculo de <i>B. licheniformis</i> M2-7.	26
Sistema de interacción.	26
Extracción de ARN total y análisis RNA-seq.	26
Análisis bioinformático.	27
Análisis de calidad.	27
Ensamblaje y alineamiento de los transcritos.	27
Análisis de la expresión diferencial de genes.	27
RESULTADOS	28
<i>Bacillus licheniformis</i> M2-7 afecta la estructura de <i>Curvularia lunata</i> SY17.	28
Perfil transcriptómico de <i>Bacillus licheniformis</i> M2-7 interaccionando con <i>Curvularia lunata</i> SY17.	28
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	33

CAPÍTULO I: BIOCONTROL DE *Curvularia lunata* EN MAÍZ CRIOLLO MEDIANTE *Bacillus licheniformis* M2-7

Bolaños-Dircio Alejandro¹, Ramírez-Rojas Sergio², Rosas-Guerrero Víctor³, Gutiérrez-Flores Carina³, Salcedo-Sánchez Edith Rosalba⁴ y Romero-Ramírez Yanet¹

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas sin número, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, México, C.P. 39070.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatepec Morelos. Km 0.5 Carretera Zacatepec, Galeana-Cuautla S/N, Centro, 62780 Zacatepec, Mor.

³Facultad en Desarrollo Sustentable, Universidad Autónoma de Guerrero. Carretera Nacional Acapulco-Zihuatanejo Km. 106 + 900 Col. Las Tunas 40900 Tecpan de Galeana, Guerrero, México.

⁴CONACYT Escuela Superior de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Guerrero. Ex Hacienda San Juan Bautista S/N, C.P. 40323, Taxco el Viejo, Guerrero, México.

RESUMEN

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn es un fitopatógeno de importancia económica en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). El uso de agentes de biocontrol como las especies del género *Bacillus* ofrecen una forma alternativa eficaz y sustentable para minimizar la severidad de la mancha foliar. En este estudio, se evaluó la acción potencial de biocontrol de *Bacillus licheniformis* M2-7 *in vitro* e *in vivo* sobre *Curvularia lunata* en plantas de maíz criollo. Los resultados de las pruebas de antagonismo *in vitro* mostraron que la cepa M2-7 inhibe el crecimiento micelial y la germinación de conidios en un 73.75 y 78.66 %, respectivamente. En las pruebas *in vivo*, las concentraciones 1×10^3 y 1×10^6 UFC de la cepa M2-7 redujeron significativamente la severidad de la enfermedad con respecto al control. Los resultados obtenidos sugieren el uso de *Bacillus licheniformis* M2-7 como agente de biocontrol contra la mancha foliar en maíz a escala comercial.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, *Curvularia lunata*, biocontrol, mancha foliar.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los tres cultivos de cereales más valiosos del mundo en términos de producción anual (Valle-Torres et al., 2020). Además, es un alimento básico para millones de personas a nivel mundial (Mie, 2017; Rosenblueth et al., 2018). La mancha foliar causada principalmente por *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, se ha vuelto en una amenaza seria para el rendimiento en la producción del maíz; siendo una enfermedad frecuente, de amplio alcance, grave, dañina y económicamente importante en áreas tropicales (Gao et al., 2014; Garcia-Aroca et al., 2018; Zhang et al., 2019, Barupal, 2020). El patógeno infecta principalmente hojas y vainas de maíz y los síntomas comunes incluyen manchas necróticas rodeadas de un halo, que luego se expanden a lesiones redondas, ovaladas, fusiformes o en tiras (Burupal y Sharma, 2017) y se desarrolla en áreas cálidas y húmedas (Munkvold y White, 2016). Se ha reportado que provoca alergias e infecciones respiratorias y dérmicas en humanos (Dean et al., 2014). Para el control de los hongos fitopatógenos de cultivos vegetales se han utilizado varias estrategias de gestión incluido el uso de fungicidas químicos, el mejoramiento de cultivares resistentes y el uso de prácticas tradicionales (Khan et al., 2020). Entre los fungicidas químicos reportados como eficaces contra la enfermedad de la mancha foliar se encuentran: propined (2%), metil tiofanato y mancozeb (Butt et al., 2011). Pero el uso indiscriminado de éstos ocasiona efectos nocivos a la salud humana, animal y ambiental (Barupal y Sharma, 2017). Por ello, en algunos lugares se ha optado por utilizar variedades de plantas de maíz mejoradas con genes de resistencia a patógenos. Sin embargo, este mejoramiento tiene que ser un proceso continuo porque los patógenos evolucionan rápidamente, generando resistencia y volviendo susceptibles a sus hospedantes (Khan et al., 2020). Ante este escenario, los enfoques que han tomado los estudios están orientados a explorar estrategias alternativas de supresión de fitopatógenos en cultivos prioritarios como el maíz, por ejemplo, el uso de agentes de control biológico (p.ej. bacterias) y sus metabolitos secundarios (Reyes et al., 2015). Existen estudios *in vitro* que sugieren el uso de *Bacillus* sp., *B. licheniformis*, actinomicetos (*Streptomyces* spp.), extractos de plantas (*Lawsonia inermis* L.) y levaduras (*Torulaspora indica* y *Wickerhamomyces anomalus*) para reducir la severidad de *Curvularia lunata* en maíz y en arroz (Basha y Ulaganathan, 2002; Bressan, 2002; Barupal et al., 2020; Limtong et al., 2020). Sin embargo, hace falta estudios *in vivo* que muestren el potencial y la eficacia de estos agentes de biocontrol. Entre los

diferentes microorganismos, resaltan las especies del género *Bacillus*, que se han considerado agentes de biocontrol, porque producen una amplia gama de metabolitos secundarios (Villareal-Delgado et al., 2017). *Bacillus licheniformis* M2-7 ha sido evaluado *in vitro* frente a hongos fitopatógenos como: *Microdochium*, *Curvularia*, *Phoma*, *Microphaeropsis* y *Fusarium*, mostrando un efecto funguicida (Bahena-Oregón et al., 2022). Además, Bolaños et al. (2021) reportaron que esta cepa bacteriana mejora el porcentaje de germinación, producción y rendimiento de cultivo de chile, por lo que podría emplearse en formulaciones agrícolas. Las formulaciones de biocontrol (biofungicidas) preparadas a partir de bacterias se aplican cada vez más en la agricultura sostenible (Wu et al., 2015). Especialmente los inoculantes preparados a partir de cepas de *Bacillus* formadoras de endosporas han demostrado ser una alternativa eficaz y respetuosa con el ambiente debido a su larga vida útil, que es comparable a la de los agroquímicos (Chowdhury et al., 2015; Wu et al., 2015). Con el fin de desarrollar estrategias sostenibles e integradas para mermar la severidad de la mancha foliar de *Curvularia lunata*; se evaluó la capacidad antagónica de *Bacillus licheniformis* M2-7 *in vitro* e *in vivo* en plantas de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo. Se empleó la cepa *Bacillus licheniformis* M2-7 y el hongo fitopatógeno *Curvularia lunata* SY17 pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental; Facultad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. La cepa M2-7 se activó en medio líquido Luria Bertani (LB) con la siguiente composición en g/L: 10.0 de peptona de caseína, 5.0 de extracto de lavadura y 10.0 de NaCl, con pH de 7.3; se incubó a 180 rpm durante 24 horas a 37 °C. Para activar el hongo fitopatógeno se utilizó el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con la siguiente composición en g/L: 4.0 de extracto de papa, 20.0 de dextrosa y 15.0 de agar bacteriológico con un pH final de 5.5 ± 0.2 , las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días. Se emplearon semillas de maíz criollo amarillo (Raza Elotes Occidentales) con quinto ciclo de selección masal en elotes aislados bajo condiciones tropicales y proporcionados por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Preparación del inóculo del patógeno. Se utilizó un cultivo fúngico de una semana de crecimiento en PDA a 30 °C, los conidios de *C. lunata* SY17 se diluyeron en 2 mL de solución salina estéril al 0.9% para su recuento en la cámara de Neubauer, la concentración se ajustó a 10⁷ conidios/mL (Constanza, 2012).

Preparación del inóculo de *B. licheniformis* M2-7. Se recuperaron las células bacterianas de un cultivo de 24 h de incubación a 37 °C en caldo nutritivo por centrifugación a 8000 rpm durante 8 min, al paquete celular se le realizó dos lavados con solución salina estéril al 0.9% y se diluyó en 2 mL de solución salina al 0.9% para su conteo en una cámara de Neubauer, la concentración se ajustó a 10⁷ células/mL (Márquez et al., 2003).

Diseño experimental y prueba de patogenicidad. Para montar el experimento se utilizó un diseño completamente al azar con 2 tratamientos y 3 repeticiones. Las semillas de maíz criollo amarillo (Raza Elotes Occidentales) fueron sembradas en bolsas de polietileno (15 x 17 cm) con sustrato estéril y se mantuvieron en un bioespacio con humedad relativa y temperatura de 70% y 25°C, respectivamente. En principio se aplicó riego de auxilio a las semillas recién sembradas y después de su germinación se regaron cada cinco días hasta alcanzar la etapa V4/V5 del desarrollo fenológico del maíz (4/5 hojas verdaderas). El tratamiento 1 estuvo constituido de 3 plantas inoculadas con *C. lunata* SY17 en el área foliar y el tratamiento control fueron 3 plantas sin inóculo fúngico. La unidad experimental estuvo constituida por la bolsa de polietileno con una planta de maíz. La inoculación se realizó por aspersión de una concentración de 10⁷ conidios/mL resuspendidos en 250 mL de agua estéril. A los 15 días después de la inoculación se evaluó el porcentaje de incidencia de la enfermedad (% ID) (Saravanakumar et al., 2016) mediante la siguiente fórmula:

$$\%ID = \frac{HI}{TH} \times 100$$

Donde HI es el número de hojas infectadas y TH es el total de hojas.

El porcentaje de incidencia de la enfermedad fue sujeto a ANOVA y prueba de t de Student (P≤0.05) (Castaño y Domínguez, 2010).

Re aislamiento y técnica de microcultivo. Para confirmar los postulados de Koch (Agrios, 2005) se tomaron muestras en hojas que presentaron síntomas de *C. lunata*. El tejido

infectado fue cortado, lavado con agua destilada estéril, cultivado en placas con medio PDA e incubado a 30 °C durante 7 días. Se preparó una cámara húmeda (Ridell, 1950), colocando agua destilada estéril y dos torundas de algodón, debajo de éstas se colocó papel filtro para evitar la desecación. Sobre las torundas se puso un portaobjetos estéril y se colocó un cubo de PDA de 1 cm², con ayuda de un asa micológica estéril se tomó micelio de *C. lunata* SY17 y se sembró sobre el medio PDA por los extremos; finalmente se colocó un cubreobjetos sobre el cuadro inoculado con el hongo y se incubó a 30 °C durante 7 días. Para la observación de estructuras en el microscopio óptico Olympus se adicionó una gota de azul de lactofenol a las muestras.

Identificación molecular. La extracción de ADN se desarrolló a partir de micelio fresco crecido en medio PDA incubado a 30 °C, empleando el kit comercial Quick-DNATM fungal/bacterial miniprep (Zymo research) siguiendo las indicaciones del proveedor. Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento (650 pb) del gen ITS utilizando los oligonucleótidos ITS1 (5'CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA'3) e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC'3). Para la PCR se colocaron buffer de reacción 10X, 2.5 µL; dNTPs 25 mM, 2 µL; MgCl₂; 1.5 µL, oligonucleótidos ITS1 e ITS4 10 pmol, 2 µL; taq DNA polimerasa recombinante (Thermo Scientific); 0.5 µL, se ajustó el volumen a 25 µL con agua destilada estéril, la muestra se amplificó por triplicado. Las condiciones de la PCR en el termociclador fueron de 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, 30 ciclos de alineamiento a 59 °C por 1 minuto, 30 ciclos de elongación a 72 °C por un minuto y 1 ciclo de elongación final a 72 °C por 1 minuto. Los productos de la ampliación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (SIGMA), se visualizaron en un fotodocumentador, se purificaron con el kit Gene JET PCR Purification (Thermo Scientific) y la secuenciación se realizó en la Unidad de secuenciación de Instituto de Biotecnología de la UNAM por el método Sanger usando didesoxiterminadores fluorescentes y un secuenciador automatizado. Se compararon las regiones amplificadas de cada hongo con las secuencias de hongos almacenados en la base de datos del GenBank por medio de la búsqueda local de alineamientos de secuencias nucleotídicas (BLAST).

Antagonismo *in vitro*. Para determinar la actividad antagónica se empleó la técnica de difusión en agar PDA. Se añadieron 5 mL (10^7 UFC/mL) de *Bacillus licheniformis* M2-7 antes de que el medio gelificara, posteriormente se colocó un explante de 5 mm de diámetro de micelio fresco de *C. lunata* SY17 en el centro. Las placas se incubaron a 30 °C durante 10 días. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = [(C-T) \times 100] \div C$$

Donde “C” es el diámetro del micelio fúngico en el testigo negativo (sin bacteria), y “T” es el diámetro del micelio en las placas tratadas con *B. licheniformis* M2-7 (Ahmad et al., 2017).

Inhibición de germinación de conidios. Los conidios de *C. lunata* SY17 se obtuvieron mediante raspado ligero de la colonia con ayuda de un portaobjetos, colocando 5 mL de agua destilada estéril a la colonia fúngica. La suspensión se filtró en gasas estériles para descartar el exceso de micelio. Se ajustó la concentración de 10^7 conidios/mL y se mezcló con 10^7 células/mL de *B. licheniformis* M2-7 (1:1 v/v) en matraces de 50 mL de capacidad. Después, se incubaron a 30 °C a 150 rpm durante 24 h. Se tomaron 10 µL de la muestra para su observación al microscopio óptico. La germinación se definió como un tubo germinativo que presentaban las células. El porcentaje de germinación se realizó contando al azar 100 conidios (proporción de conidios germinados) con respecto al total observado. Este ensayo se realizó por triplicado (Mahadtanapuk et al., 2007).

Prueba de antagonismo *in vivo*. Se sembraron dos semillas de maíz amarillo (raza occidental) en bolsas de polietileno (15 x 17 cm) con tierra común y se mantuvieron en un vivero. Las semillas se regaron cada tres días hasta alcanzar la etapa V4/V5 del desarrollo fenológico del maíz (4/5 hojas verdaderas). El proceso de inoculación del fitopatógeno se realizó por aspersión de una concentración de 10^7 conidios por mL⁻¹ resuspendidos en 250 mL de agua estéril. El diseño experimental empleado fue completamente al azar con 4 tratamientos y 5 repeticiones. Los tratamientos fueron: tratamiento 1 (T1) funguicida químico (Metalaxil); tratamiento 2 (T2) *Bacillus licheniformis* M2-7 (1×10^3 UFC); tratamiento 3 (T3) *B. licheniformis* M2-7 (1×10^6 UFC) y tratamiento 4 (T4) control, plantas tratadas con agua estéril. La unidad experimental estuvo constituida por la bolsa de polietileno con dos

plantas de maíz. Los datos de severidad se obtuvieron con ayuda del programa Imagen J 2.0 y se analizaron con ANOVA y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

***Curvularia lunata* SY17 es un fitopatógeno en plantas de maíz.**

Las pruebas de patogenicidad de *Curvularia lunata* SY17 se realizó mediante la técnica de aspersión en hojas de plantas de maíz criollo amarillo (Raza Elotes Occidentales). Se evidenció el crecimiento fúngico durante el tiempo de 5 días después de la inoculación en hojas a través de síntomas ocasionados (mancha foliar). Los síntomas observados fueron manchas ovaladas, circulares o alargadas; con un borde irregular y el centro gris o marrón oscuro en la periferia, dentro de un halo amarillo con 0.5 a 2 mm de diámetro (Figura 1A). El porcentaje de incidencia causada fue del 99.33% en el tratamiento 1 (T1) y un 0% en el tratamiento control (T0) (Figura 1B).

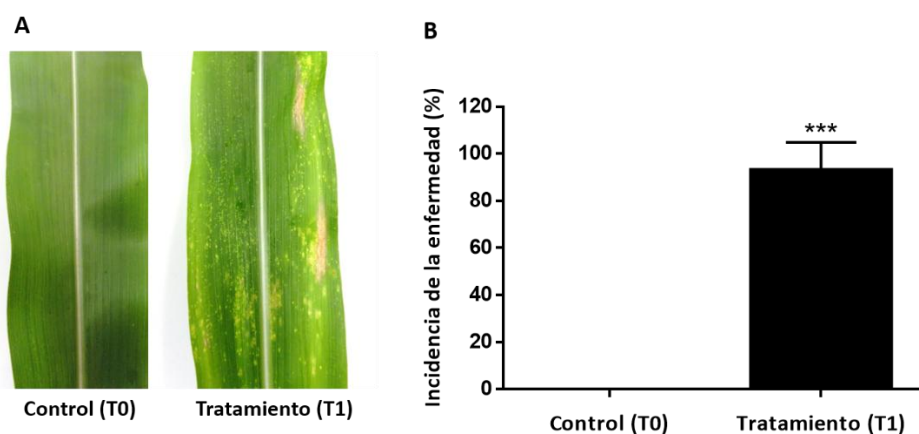


Figura 1. Incidencia de la enfermedad mancha foliar en maíz amarillo. A) Lesiones ocasionadas por *Curvularia lunata* SY17 en etapa V4/V5 de maíz amarillo (Raza Elotes Occidentales) (T1) con respecto al control (T0) después de 5 días de la inoculación. B) Porcentaje de incidencia de la enfermedad. *** Indica diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$, t de Student). Barras de error indican Desviación Estándar (DE) ($n=3$).

La cepa SY17 corresponde a *Curvularia lunata*.

La morfología macro y microscópica del hongo re aislado fue consistente con descripciones previas de *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn (Bahena-Oregón et al., 2022). El anverso de la colonia es algodonoso de color verde oliváceo y con un margen fimbriado; mientras que el reverso es negro (Figura 2A y 2B). A nivel microscópico, el hongo desarrolló hifas vegetativas septadas o tabicadas, ramificadas subhialinas a pardas. Los conidios son lisos de cuatro celdas, curvados en la tercera celda desde la base, las células centrales son de color marrón y las terminales subhialinas o marrón claro (Figura 2C y 2D).

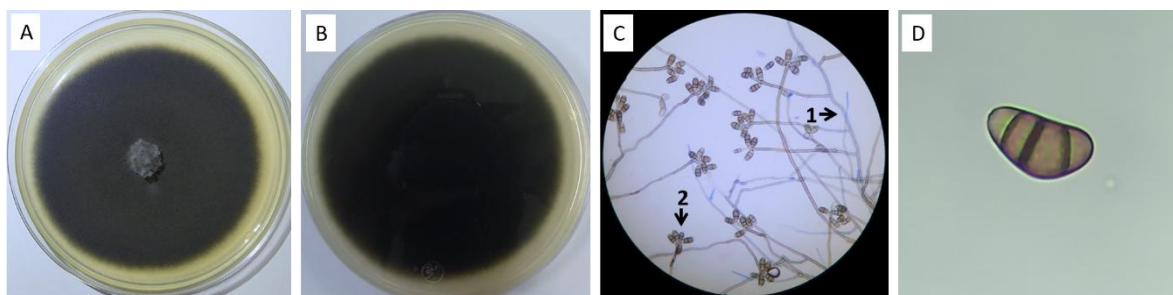


Figura 2. Morfología del reaislamiento de *Curvularia lunata* SY17. A) Anverso, colonia en agar PDA después de 7 días de incubación a 30 °C; B) reverso colonial del hongo; C) Hifas vegetativas tabicadas (C1) y conidióforos (C2) y D) conidio.

Para la identificación molecular se utilizó ADN genómico a una concentración de 4 ng/μL. Se realizó la amplificación por la técnica de PCR, logrando obtener una fracción de 650 pb, correspondiente a la región ITS1-4 del gen 18S (Dato no mostrado) que se secuenció para poder sugerir la identidad del género asociado al hongo re aislado.

***Bacillus licheniformis* M2-7 inhibe el crecimiento de *Curvularia lunata* SY17 en condiciones *in vitro*.**

Se realizaron enfrentamientos duales de *Bacillus licheniformis* M2-7 contra *Curvularia lunata* SY17 en medio PDA por el método de dilución. En este ensayo se evidenció la capacidad de la cepa bacteriana de inhibir el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno, logrando un porcentaje de inhibición del 73.75% con respecto al control ($P \leq 0.05$; Figura 3). Además, se observó hinchamiento y deformación de hifas después de 10 días de incubación con respecto al tratamiento control.

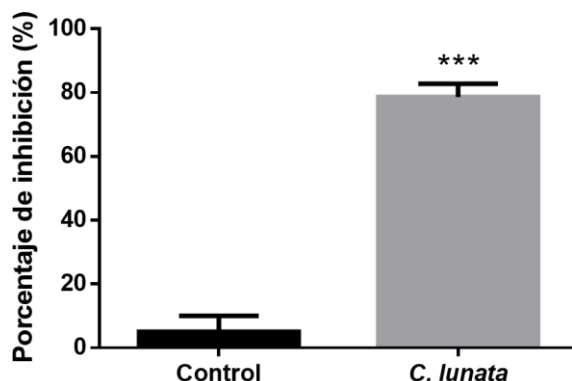


Figura 3. Porcentaje de inhibición de *Bacillus licheniformis* M2-7 contra *Curvularia lunata* SY17. *** Indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$, t de Student). Las barras de error indican Desviación Estándar (DE) de tres experimentos independientes (n=3).

***Bacillus licheniformis* M2-7 inhibe la germinación de conidios de *Curvularia lunata* SY17.**

Se logró determinar la efectividad de *Bacillus licheniformis* M2-7 sobre la inhibición de la germinación de conidios (esporas) de *C. lunata* SY17 mediante confrontación directa en caldo nutritivo. La cepa bacteriana fue capaz de inhibir hasta un 78.66% después de 24 horas de incubación, mostrando un efecto fungistático con respecto al tratamiento control ($P \leq 0.05$; Figura 4).

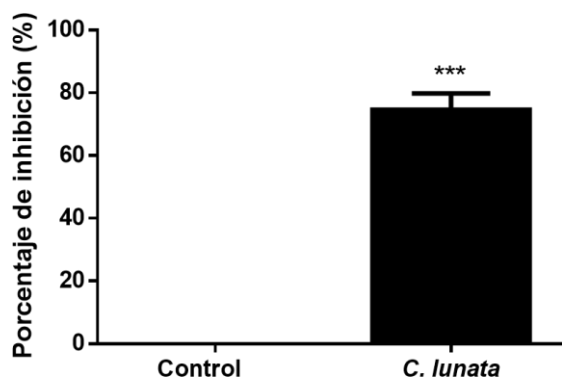


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la germinación conidios de *Curvularia lunata* SY17 por *Bacillus licheniformis* M2-7. *** Indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$, t de Student). Las barras de error indican Desviación Estándar (DE) de tres experimentos independientes (n=3).

***Bacillus licheniformis* M2-7 reduce el crecimiento de *Curvularia lunata* SY17 en hojas de maíz.**

Para evaluar la capacidad de biocontrol de la cepa bacteriana, se realizaron pruebas de antagonismo en hojas de maíz en etapa V4/V5 infectadas con *Curvularia lunata* SY17. En las plantas de maíz, las hojas tratadas con las dos concentraciones (T2: 1×10^3 y T3: 1×10^6 UFC) mostraron una reducción del área con síntomas en comparación con las plantas no tratadas (T4) después de 15 días de la inoculación (Figura 5). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas de éstas con respecto al fungicida químico (T1) ($P < 0.05$).

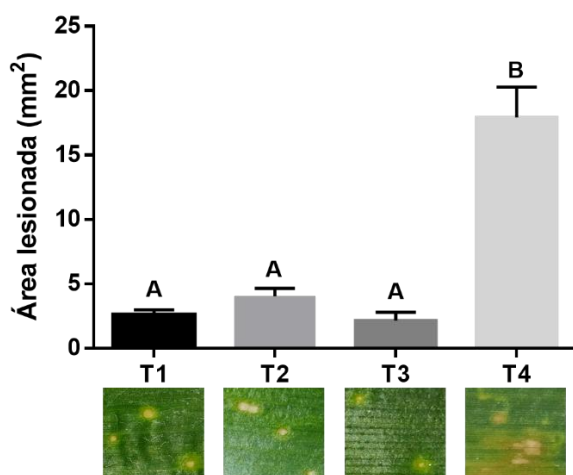


Figura 5. Efecto *in vivo* de la presencia de *Bacillus licheniformis* M2-7 contra *Curvularia lunata* SY17 en hojas de maíz. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$, Tukey). Las barras de error indican Desviación Estándar (DE) de tres experimentos independientes ($n=6$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Con nuestro trabajo se confirmó la fitopatogenicidad de *Curvularia lunata* SY17 observando una incidencia de la enfermedad Mancha foliar del 99.33%, mientras que en el tratamiento control fue del 0%. Observamos los síntomas reportados por García-Aroca et al. (2018), quienes al realizar pruebas de patogenicidad en maíz en etapa vegetativa V4/V5, los describen como lesiones redondas a ovaladas, de color marrón claro de 2.0 mm de diámetro, márgenes de color marrón rojizo, a menudo con halos cloróticos en la parte media y superior del dosel del maíz (híbrido DKC 66-19). Además, Jiménez et al. (2022) describen los

síntomas foliares como lesiones pequeñas, circulares y de color marrón claro a tostado (de 0.5 a 3 mm de diámetro) con bordes de color marrón rojizo en plantas de maíz híbrido (Progenie 9114VT2P). Sin embargo, ambos trabajos no reportan el porcentaje de incidencia de esta patología. El uso del parámetro incidencia es particularmente útil para entender la velocidad y patrón de avance de la enfermedad en maíz. La mancha foliar se ha registrado en áreas cálidas y húmedas donde ocasiona daños significativos. Recientemente se ha reportado en Louisiana (García-Aroca et al., 2018), Kentucky (Anderson et al., 2019), Delaware (Henrickson y Koehler, 2021) y Mississippi (Jimenez et al., 2022). En México, Ríos-Herrera et al. (2017) identificaron molecularmente a *C. lunata* asociada a la mancha de asfalto en maíz, en los estados de Guerrero y Chiapas.

Bacillus licheniformis M2-7 fue capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo micelial y la germinación de conidios de *C. lunata* SY17 en condiciones *in vitro*. Varias especies del género *Bacillus* son conocidas como productoras de una amplia gama de compuestos antagónicos de diferentes estructuras, dedicando entre el 5 y el 8% del genoma total a la biosíntesis de metabolitos secundarios (Fira et al., 2018). Dentro de las moléculas bioactivas más importantes se encuentran los lipopéptidos, compuestos poliquétidos, bacteriocidas y sideróforos (Ructert et al., 2011; Zhao et al., 2017). Nuestros resultados obtenidos coinciden con los reportados por Jeong et al. (2017) quienes evidenciaron que *B. licheniformis* MH48 transformó la morfología conidial e inhibió la germinación conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* y degradó el micelio de *Rhizoctonia solani* a una concentración de 50 y 200 ug/ml de ácido benzónico, respectivamente. Mientras que Nawaz et al. (2018) demostraron que *Bacillus licheniformis* 0E-04 distorsiona las hifas y ocasiona la formación de vesículas grandes en el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gossypii* a las 48 h de incubación. El efecto antifúngico se atribuyó al mecanismo de acción de los biosurfactantes de la cepa bacteriana. En otra investigación previa, Che et al. (2020) encontraron cambios morfológicos notables en las hifas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* en presencia de *Bacillus licheniformis* X-1 y *Bacillus methylophilicus* Z-1. La cepa X-1 se adhirió a las hifas, provocando arrugamiento y deformidad de las hifas, mientras que la cepa Z-1 provocó hinchazón de las hifas, extrusión de protoplasma y microporos. Finalmente, Albarrán- de la Luz et al. (2022) demostraron que las cepas M2-7 y LYA12 de *Bacillus licheniformis* afectaron la apariencia micelial de los hongos *Aspergillus oryzae*, *Colletotrichum* sp. y *Aspergillus niger*

provocando hinchazones, malformaciones y escaso crecimiento de las hifas. Este efecto fue detectado mediante la expresión de dos metacaspasas (*casA* y *casB*) que desencadenan el proceso de muerte celular programada en hongos. Nuestros resultados sugieren el uso de la bacteria *B. licheniformis* M2-7 en formulaciones agrícolas en cultivos prioritarios como el maíz.

Se demostró que *Bacillus licheniformis* M2-7 es capaz de inhibir el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* SY17 en hojas de maíz. Las dos concentraciones de la cepa (1×10^3 y 1×10^6 UFC) resultaron efectivas para la protección de las plantas en comparación al tratamiento control. El efecto antifúngico de la bacteria podría deberse a la competencia nutricional y a la producción de algunas moléculas difusibles que pueden evitar o reducir el crecimiento del patógeno (Brader et al., 2014). *Bacillus licheniformis* M2-7 ha sido reportado como productor de metabolitos secundarios como: amilasas, proteasas, esterases, biosurfactantes y compuestos orgánicos volátiles, los cuales pueden actuar como agentes de biocontrol (Bolaños et al., 2021). Nuestros resultados coinciden con el trabajo realizado por Nigris et al. (2018) quienes demostraron que *Bacillus licheniformis* GL174 fue capaz de inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos (*Phaeoacremonium aleophilum*, *Botryosphaeria* spp., *Botrytis cinérea*, *Phytophthora infestans* y *Sclerotinia sclerotiorum*) y reducir la gravedad de la infección *in vitro* e *in vivo* en *Vitis vinifera* Glera. Los resultados obtenidos demuestran que *Bacillus licheniformis* M2-7 podría actuar en plantas de maíz como agente de biocontrol, dada su capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de *Curvularia lunata* SY17 y mermar la gravedad de la infección *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios G.N. (2005). Plant pathology (2ª ed). Londres, Inglaterra: LIMUSA, 819 pp.
- Ahmad Z., Wu L., Chen L. y Dong W. (2017). Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. Reports Scientific 7, 1777-1790. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01940-9>
- Albarrán-de la Luz L., Rodríguez-Barrera M., Hernández-Flores G., Lopezaraiza-Mikel M., Alemán-Figueroa L., Toribio-Jiménez J. y Romero-Ramírez Y. (2022). Antagonism of *Bacillus licheniformis* M2-7 against phytopathogen fungi of *Mangifera indica* L. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 38,1-10. <https://doi.org/10.20937/RICA.54217>
- Anderson N.R., Mehl K.M., Neves D.L., Bradley C.A. y Wise A. (2019). First report of *Curvularia* Leaf Spot of corn, caused by *Curvularia lunata*, in Kentucky. Plant Health Progress 1-3. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0629-PDN>
- Bahena-Oregón R., Rodríguez-Barrera M.A., Rosas-Guerrero V., Méndez Bahena A., Toledo-Hernández E., Toribio-Jiménez J., Navez-González D., Palemón-Alberto F., Ortega-Acosta S.A., y Romero-Ramírez Y. (2022). Chapter 8.3. *Bacillus licheniformis* M2-7 inhibits the growth and affects the structure of phytopathogenic fungi of *Zea mays*. En: Ambiente y Bioenergía. Perspectivas y avances de la sostenibilidad (ABIAER A.C., Ed.). México City, México, pp. 500-508.
- Barupal T. y Sharma K. (2017). Effect of leaf spot extracts of *Lawsonia inermis* Linn. On *Curvularia lunata*, caused leaf spot disease of maize. International Journal of Innovative Research and Advanced Studies 4 (2), 64-67.
- Barupal T., Meena M. y Sharma K. (2020). Comparative analysis of bioformulations against *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn causing leaf spot disease of maize. Archives of Phytopathology and Plant Protection 54: 5-6, 261-272. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1827657>
- Basha S. y Ulaganathan S. (2002). Antagonisms of *Bacillus species* (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. Current Science 82 (12), 1458-1463. <https://www.jstor.org/stable/24106181>
- Bolaños-Dircio A., Toribio-Jiménez J., Rodríguez-Barrera M.A., Hernández-Flores G., Toledo-Hernández E., Palemón-Alberto F. y Romero-Ramírez Y. (2021). *Bacillus*

licheniformis M2-7 improves the growth and performance of *Capsicum annuum* L. Agrociencias 55 (3), 227-242. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i3.2415>

Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F. y Sessitsch A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. Cocurrent Opinion in Biotechnology 27, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>

Bressan W. (2002). Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. BioControl 48, 233-240. <https://doi.org/10.1023/A:1022673226324>

Butt A.R., Yaseen I. y Javaid A. (2011). Seed-borne mycoflora of stored rice grains and its chemical control. The Journal of Animal & Plant Sciences 21 (2), 193-196.

Chen Y., Xu Y., Zhou T., Akkaya M., Wang L., Li S. y Li X. (2020). Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in strawberries using bioorganic fertilizer fortified with *Bacillus licheniformis* X-1 and *Bacillus methylotrophicus* Z-1. Biotechnology 10, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2060-6>

Chowdhury S.P., Hartmann A., Gao X.W. y Borris R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review. Frontiers in Microbiology 6 (780), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>

Constanza C.L., Cosuelo S.L., Cuervo P.J., Joya A.J. y Marquez K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). NOVA 10 (17), 64-82. <https://doi.org/10.22490/24629448.518>

Dean R.A., Lichens-Park A. y Kole C. (2014). Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens. Springer Berlin Heidelberg.

Fira D., Dimkic I., Beric, T., Lozo J. y Stankovic S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. Journal of Biotencology 285, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.biotec.2018.044>

Gao S., Li Y., Gao J., Suo Y., Fu K., Li Y. y Chen J. (2014). Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. BMC Genomics 15 (1), 627. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-627>

García-Aroca T., Doyle V. y Singh R. (2018). First report of *Curvularia* leaf spot of corn, caused by *Curvularia lunata*, in the United States. Plant Health Progress 19, 140-142. <https://doi.org/10.1094/PHP-02-18-0008-BR>

Guevara-Luna J., Serrano-Ángel L.I., Rodríguez-Barrera M. Ángel., Hernández-Flores G., Toribio-Jiménez J., Toledo-Hernández E., y Romero-Ramírez Y. (2022). Isolated bacteria from hot springs able to use hydrocarbons as carbon source. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental* 38, 68–77. <https://doi.org/10.20937/RICA.54234>

Henrickson M. y Koehler A.M. (2021). First report of *Curvularia lunata* causing Curvularia leaf spot in corn in Delaware. *Plant Disease* 106,319. <https://doi.org/10.1094/PDIS-0421-0742-PDN>

Jeong M.H., Lee Y.S., Cho J.Y., Ahn Y.S., Moon J.H., Hyun H.N., Chan G.S. y Kim K.Y. (2017). Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial Pathogenesis* 110, 645-653. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.027>

Jimenez Madrid A.M., Allen T.W., Vargas A., Connor A. y Wilkerson T.H. (2021). First report of *Curvularia* leaf spot of field corn, caused by *Curvularia lunata*, in Mississippi. *Plant Health Progress* 1-3. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2189-PDN>

Khan R.A.A., Najeeb S., Hussain S., Xie B. y Li Y. (2020). Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. Against phytopathogenic fungi. *Microorganisms* 8 (6), 817. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060817>

Limtong S., Into P. y Attarat P. (2020). Biocontrol of rice seedling rosette disease caused by *Curvularia lunata* and *Helminthosporium oryzae* by epiphytic yeasts from plant leaves. *Microorganisms* 8 (5), 2-18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050647>

Mahadtanapuk S., Sanguanserm Sri M., Cutler R.W., Sardud V. y Anuntalabhochai S. (2007). Control of anthracnose caused by *Colletotrichum musae* on *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using antagonistic *Bacillus* spp. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 2 (2), 54-61. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2007.54.61>

Márquez G.M.E., Torres S.L.A. y Escobar H.M. (2003). Evaluación del efecto nematicida de cepas de *Bacillus* spp. *Fitosanidad* 7, 55-58.

Mie A., Andersen H.R., Gunnarsson S., Kahl J., Kesse-Guyot E., Rembialkowska E., Quaglio G. y Grandjean P. (2017). Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review. *Environmental Health* 16 (111), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0315-4>

Mishra P., Singh U., Pandey C.M., Mishra P. and Pandey G. (2019). Application of Student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Annals of Cardiac Anaesthesia* 22, 407-411. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_94_19

Munkvold G.P. y White D.G. (2016). *Compendium of Corn Diseases*. Fourth Edition. The American Phytopathological Society, APS Press.

Nawaz H.H., Rajaofera M.J., He Q., Anam U., Lin Ch. y Miao W. (2018). Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* 0E-04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 146, 33-42. <https://doi.org/j.pestbp.2018.02.007>

Nigris S., Baldan E., Tondello A., Zanella F., Vitulo N., Favaro G., Guidolin V., Bordin N., Telatin A., Barizza E., Marcato S., Zottini M., Squartini A., Valle G. y Baldan B. (2018). Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv Glera. *BMC Microbiology* 18 (133), 2-16. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1306-5>

Reyes A., Ricón G., López L., Martínez Z.E. y Quiñones E. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria UNAM* 16, 2-15.

Ridell R. (1950). Permanet stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycology* 42 (2), 265-270. <https://doi.org/10.1080/00275514.1950.12017830>

Ríos- Herrera E.N., Ochoa F.Y.M., Cerna Ch. E., Landeros F.J., Cepeda S.M. y Rodríguez G.R. (2017). Hongos asociados a la mancha de asfalto en el cultivo de maíz en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8 (2), 457-462.

Rosenblueth M., Ormeño-Orrillo E., López-López A., Rogel M.A., Reyes-Hernández B.J., Martínez-Romero J.C., Reddy P.M. y Martínez-Romero E. (2018). Nitrogen fixation in cereals. *Frontiers in Microbiology* 9 (1794), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>

Ruckter C., Blom J., Chen X.H., Reva O. y Borriss R. (2011). Genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal Biotechnology* 155, 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.006>

Saravanakumar K., Yu C., Dou K., Wang M., Li Y. y Chen J. (2016). Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced

biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Biological Control 94, 37-46.
<https://doi.org/10.1016/b.biocontrol.2015.12.001>

Tan Y.P., Crous P., y Shivas R.G. (2018). Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. MycoKeys 35, 1-25.
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.35.25665>

Valle-Torres J., Ross T.J., Plewa D., Avellaneda M.C., Check J., Chilvers M.I., Cruz A.P., Dalla F., Groves C., Gongora-Canul C., Henriquez-Dole L., Jamann T., Kleczwski N., Lipps S., Malvick D., McCoy A.G., Mueller D.S., Paul P.A., Puerto C., Raid R.N., Robertson A., Roggenkamp A.M., Smith D.L., Telenko D.E.P. y Cruz C.D. (2020). Tar spot: An understudied disease threatening corn production in the Americas. Plant Disease 104, 2541-2550. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-20-0449-FE>

Villarreal-Delgado M.F., Villa-Rodríguez E.D., Cira-Chávez L.A. y Estrada-Alvarado M.I. (2017). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología 36 (1), 95-130.

Wu L., Wu H.J., Qiao J., Gao X. y Borris, R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. Frontiers in Microbiology 6 (1395), 1-13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>

Zhang D., Wang F., Zhao J., Sun J., Fu D., Liu K., Chen N., Li G., Xiao S. y Xue C. (2019). Virulence, molecular diversity, and mating type of *Curvularia lunata* in China. Plant Disease 103, 1728-1737. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1857-RE>

Zhao H., Shao D., Jiang C., Shi J., Huang Q., Shahid M., Rajoka R., Yang H. y Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. Applied Microbiología and Biotechnology 101, 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>

Capítulo II: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL ANTAGONISMO DE *Bacillus licheniformis* M2-7 CONTRA *Curvularia lunata* SY17 CAUSANTE DE LA MANCHA FOLIAR EN MAÍZ

Bolaños-Dircio Alejandro¹, Ramírez-Rojas Sergio², Rosas-Guerrero Víctor³, Gutiérrez-Flores Carina³, Salcedo-Sánchez Edith Rosalba⁴, Mariana Reyes Prieto⁵ y Romero-Ramírez Yanet¹

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma de Guerrero. Avenida Lázaro Cárdenas sin número, Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, México, C.P. 39070.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Zacatepec Morelos. Km 0.5 Carretera Zacatepec, Galeana-Cuautla S/N, Centro, 62780 Zacatepec, Mor.

³Facultad en Desarrollo Sustentable, Universidad Autónoma de Guerrero. Carretera Nacional Acapulco-Zihuatanejo Km. 106 + 900 Col. Las Tunas 40900 Tecpan de Galeana, Guerrero, México.

⁴CONACYT Escuela Superior de Ciencias de la Tierra, Universidad Autónoma de Guerrero. Ex Hacienda San Juan Bautista S/N, C.P. 40323, Taxco el Viejo, Guerrero, México.

⁵FISABIO, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana, España. Av. De Catalunya, 21, 46020 Valencia, Valencia.

RESUMEN

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn es el principal agente causal de la mancha foliar del maíz en alrededor del mundo. El control de esta enfermedad se basa en el uso de fungicidas químicos. Por lo tanto, el uso de agentes de control biológico como *Bacillus licheniformis* M2-7 es una medida sustentable para esta enfermedad en maíz. Sin embargo, existe información limitada sobre los mecanismos moleculares que se desencadenan en las bacterias antagonistas frente a hongos fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue elucidar los mecanismos moleculares antifúngicos de la cepa M2-7 contra *C. lunata* SY17 utilizando análisis del transcriptoma. La cepa M2-7 provocó al hongo fitopatógeno hinchamiento, deformidad, ruptura de las hifas y reducción de la germinación de conidios desde el segundo

día de interacción. En este tiempo se realizó el análisis del transcriptoma de la bacteria de manera individual y en co-cultivo con el hongo fitopatógeno, revelando que 35 genes fueron sobrerregulados y 2 genes fueron infraexpresados. Los genes sobrerregulados son genes asociados a la esporulación de la bacteria. Los genes *coxA*, *liaL* y *sspB* se validaron por PCR cuantitativa en tiempo real, logrando expresiones de 45.11, 61.75 y 1.24 veces respectivamente en condiciones de interacción. Este estudio nos proporciona evidencia que la cepa M2-7 estaría ejerciendo un efecto antagónico frente a *C. lunata* SY17 por la acción de esporas.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, mancha foliar, *Curvularia lunata*, biocontrol, transcriptoma.

INTRODUCCIÓN

La mancha foliar causada por *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn es una de las enfermedades fúngicas más graves que limitan la producción sostenible del maíz en el mundo, ya que puede presentarse en cualquier fase de desarrollo de la planta (Akonda et al., 2015; Zhang et al., 2019; Barupal et al., 2020). También puede infectar la mazorca de maíz, particularmente cuando hay altos niveles de incidencia en el campo, lo que dificulta su desarrollo y la formación de granos al disminuir la capacidad fotosintética (Shi-gang et al., 2017). Cuando *Curvularia* infecta la planta de maíz produce la toxina M5HF2C, almacenándose en los granos de la mazorca, convirtiéndose en un grave riesgo para la salud de los seres humanos (Shi-gang et al., 2017).

La gestión de esta enfermedad se limita, en gran medida, al uso intensivo de funguicidas químicos (propineb al 0.2 %, metil tiofanato, mancozeb e imazalil 800 pp) y al uso de variedades resistentes (Cristóbal-Alejo et al., 2013). Sin embargo, su uso prolongado y poco razonable puede producir resistencia de los patógenos y efectos adversos en la salud humana, animal y ambiental (Ab Rahman et al., 2018). Por ello, el biocontrol a través de metabolitos secundarios bacterianos ha recibido una atención considerable debido a su eficacia y respeto con el medio ambiente, principalmente edáfico, desde el enfoque de la seguridad alimentaria (Mnif y Ghribi, 2015).

Las cepas del género *Bacillus* se ubican entre los agentes de biocontrol más investigados, es decir, biofungicidas que suprimen la actividad de patógenos de plantas (Mnif y Ghribi, 2015; Fira et al., 2018). La inhibición del crecimiento y desarrollo de patógenos por bacterias del género *Bacillus* conlleva la competencia por alimento o nutrientes y espacio, la síntesis de antibióticos, enzimas líticas (p.ej. proteasas, glucanasas, etc.), sideróforos y la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Beneduzi et al., 2012; Miljakovic et al., 2020). En los últimos años se han descubierto numerosos metabolitos secundarios con capacidad antifúngica en especies del género *Bacillus*, en las que se encuentra *Bacillus licheniformis* (Fira et al., 2018; Won et al., 2021). Varios estudios reportan que *Bacillus licheniformis* tiene efectos de biocontrol sobre enfermedades de las plantas ocasionadas por hongos, oomicetos, bacterias, virus y nemátodos (Bhai et al., 2019; Abdelkhalek et al., 2020; Panichikkal et al., 2021; Upadhyay y Mohan, 2021; Bahena-Oregón et al., 2023). *Bacillus licheniformis* M2-7 ha sido reportado como productor de metabolitos secundarios como: amilasas, proteasas, esterases, biosurfactantes y compuestos orgánicos volátiles, los cuales pueden actuar como agentes de biocontrol (Bolaños-Dircio et al., 2021). Se ha evidenciado en ensayos *in vitro* que *Bacillus licheniformis* M2-7 inhibe el crecimiento micelial y la germinación de conidios (esporas) de *Curvularia lunata* SY17 en un 73.75 y 78.66%, respectivamente (Bolaños-Dircio et al., 2023). En pruebas *in vivo*, las concentraciones 1×10^3 y 1×10^6 UFC de la cepa M2-7 redujeron significativamente la gravedad de la enfermedad con respecto al control (Bolaños-Dircio et al., 2023 En revisión). Sin embargo, los mecanismos reguladores y de respuesta ante el antagonismo de hongos fitopatógenos siguen siendo en gran medida desconocidos.

Las herramientas de secuenciación de siguiente generación (NGS) ofrecen nuevos métodos para realizar la secuenciación de genomas completos y para analizar e indagar genes particulares que intervienen en el control biológico, como los casos de las especies del género *Bacillus* (Lefort et al., 2014; Dunlap et al., 2015). En este contexto, la secuenciación masiva de ARN-seq permite analizar mecanismos moleculares específicos durante una interacción determinada (Wilhelm y Landry, 2009), como los genes que intervienen en el sistema de interacción de un organismo antagonista con un organismo fitopatógeno (Zhang et al., 2015). Por ejemplo, Hao et al. (2019) revelaron que casi mil genes expresados diferencialmente se relacionaron con el proceso de maduración de *Bacillus velezensis* F21 desencadenando RSI

(Resistencia Sistémica Inducida) en presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* en plantas de sandía. Asimismo, hubo un aumento de expresión de factores de transcripción (FT), genes de resistencia a enfermedades de la planta y las actividades de algunas enzimas de defensa, como CAT, PDO y SOD. En otro estudio, Zhang et al. (2022) demostraron a través de un análisis del transcriptoma que los genes 304 y 55 de *Aternaria solani* se expresaron diferencialmente después de tratamientos con fengicinas producidos por *Bacillus subtilis* de 2 y 6 h. El metabolismo de la pared celular y la membrana celular fueron los principales procesos afectados por el estrés de las fengicinas. Zhang et al. (2022) realizaron un análisis del transcriptoma de *Fusarium pseudograminearum* en presencia de *Bacillus velezensis* YB-185 donde revelaron 5086 genes expresados diferencialmente (GED) en comparación con el control. Estos GED incluían genes para la síntesis de glucano, ácidos grasos, los canales iónicos mecanosensibles, la peróxido dismutasa, la tiorredoxina y las enzimas que degradan la pared celular de las plantas. Aunque estos estudios han explorado las interacciones planta-patógeno, son pocos los reportes sobre los mecanismos moleculares en el proceso de biocontrol. Por ello, en el presente estudio se utilizó la metodología de ARN-seq para reconocer los genes expresados diferencialmente durante el sistema de interacción de *Bacillus licheniformis* M2-7 y *Curvularia lunata* SY17 y así poder llegar a un mejor entendimiento de su asociación y desarrollar biofungicidas con sustancias antimicrobianas como componentes principales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo. Se utilizó la cepa bacteriana *Bacillus licheniformis* M2-7 y el hongo fitopatógeno *Curvularia lunata* SY17 pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Facultad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. La bacteria se cultivó en medio líquido Luria Bertani (LB) con la siguiente composición en g/L: 10.0 de peptona de caseína, 5.0 de extracto de lavadura y 10.0 de NaCl, con pH de 7.3; se incubó a 180 rpm durante 24 horas a 37 °C. Para activar el hongo fitopatógeno se utilizó el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) con la siguiente composición en

g/L: 4.0 de extracto de papa, 20.0 de dextrosa y 15.0 de agar bacteriológico con un pH final de 5.5 ± 0.2 , las placas se incubaron a 30 °C durante 7 días.

Preparación del inóculo del patógeno. Se utilizó un cultivo fúngico fresco de una semana de crecimiento en PDA a 30 °C, los conidios de *C. lunata* SY17 se diluyeron en 2 mL de solución salina estéril al 0.9% (Constanza, 2012). Se inoculó 500 µL de la resuspensión en el experimento del sistema de interacción.

Preparación del inóculo de *B. licheniformis* M2-7. Se recuperaron las células bacterianas de un cultivo de 24 h de incubación a 37 °C de medio LB líquido por centrifugación a 180 rpm por 8 min, el paquete celular se le realizaron dos lavados con solución salina estéril al 0.9% y se diluyeron nuevamente en 2 mL de solución salina al 0.9%. La concentración inicial se ajustó a una densidad óptica de 0.05 células/mL (Márquez et al., 2003).

Sistema de interacción. Para evaluar los cambios morfológicos de *C. lunata* SY17 ante la presencia de *B. licheniformis* M2-7, se realizó un ensayo de interacción directa en LB líquido y su tratamiento testigo (monocultivo del hongo fitopatígeno). Este ensayo se realizó por triplicado. Con el fin de visualizar la interacción, se tomaron 5 µL de las muestras a los 2, 4, 6 y 8 días y se colocaron en un portaobjetos. Adicionalmente, cada muestra se tiñó con azul de algodón y se visualizaron en un microscopio óptico (Olympus).

Extracción de ARN total y análisis RNA-seq. Se tomaron muestras por triplicado de *Bacillus licheniformis* M2-7 a partir de cultivos en LB líquido a los dos días de interacción. El grupo control corresponde a *B. licheniformis* M2-7 (B1_S20, B2_S21 y B3_S22) y el grupo experimental a *B. licheniformis* M2-7 en presencia de *C. lunata* SY17 (BC1_S23, BC2_S24 y BC3_S25). Las células fueron colectadas y resuspendidas en buffer de lisis (15 mg/mL^{-1} de lisozima, 1 mM de EDTA y 30 mM de Tris-HCl), se incubaron a 37°C durante 30 minutos y se homogenizaron con ayuda de un vortex para romper la pared celular. Después, se realizó la extracción de ARN con el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 15596-026, Waltham, MA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación de alto rendimiento de ARN se realizó en el Servicio de la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva (UUSMB), del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El ARNr se eliminó mediante el protocolo Ribo-Zero RNAr Renova Kit (Bacteria) (Illumina). Las bibliotecas de secuenciación se

realizaron utilizando el protocolo TruSeq Stranded (Illumina) y se secuenciaron con la plataforma Illumina HiSeq, produciendo lecturas de 150-200 pb.

Análisis bioinformático. Después de la secuenciación se obtuvieron los datos en formato fasta y fastq. El análisis bioinformático consistió en los siguientes pasos: a) análisis de calidad de las lecturas, b) ensamblaje y alineamiento y, c) identificación de genes expresados diferencialmente. Para ello, se emplearon programas bioinformáticos del sistema operativo Ubuntu de GNU/Linux.

Análisis de calidad. El análisis de calidad de las secuencias del transcriptoma se realizó con el programa MultiQC versión 1.14 (Chen et al., 2018). Para la limpieza de lecturas se utilizó la herramienta fastp, que permite la eliminación de lecturas de mala calidad y quimeras de nucleótidos (Anders et al., 2015). Este programa dispuso un puntaje Phred a cada nucleótido, los organizó y descartó aquellos que tuvieron mala calidad ($\text{Phred} \geq 30$) (Van-Verk et al., 2013).

Ensamblaje y alineamiento de los transcritos. Este paso se realizó con el programa FLASH, donde los contigs se alinearon con el genoma de referencia de *B. licheniformis* a partir del Genes&Genome Portal ejecutando el programa Bowtie2. Este programa bioinformático facilitó analizar la expresión y el descubrimiento de nuevos genes mediante secuenciación de alto rendimiento de ARN-Seq (Chu y Corey, 2012).

Análisis de la expresión diferencial de genes. Finalmente, se realizó la anotación; es decir, la identificación de las principales características de las lecturas. Las bases de datos que se emplearon fueron: a) BLAST que comparó la secuencia problema con respecto a las secuencias que se encuentran en la base de datos; y b) UniProtKB que asoció los genes expresados con rutas metabólicas para sugerir su posible función. Los genes expresados diferencialmente (GED) de *B. licheniformis* M2-7 frente a *C. lunata* SY17 se determinaron mediante el software DESeq2.

RESULTADOS

***Bacillus licheniformis* M2-7 afecta la estructura de *Curvularia lunata* SY17.**

El cultivo dual de *Bacillus licheniformis* M2-7 y *Curvularia lunata* SY17, así como el monocultivo del hongo se visualizaron en un microscopio óptico con la finalidad de apreciar su interacción a los 2, 4, 6 y 8 días (Figura 1). El crecimiento de la cepa SY17 en monocultivo fue normal (Figura 1a); mientras que en presencia de *Bacillus licheniformis* M2-7 se observó hinchamiento, deformación de hifas, ruptura de hifas y deformidad de conidios en el transcurso del tiempo de interacción (Figura 1b). Estos resultados nos permitieron detectar el tiempo en que la bacteria estaría activando sus mecanismos de antagonismo y es el tiempo en el que se analizó la respuesta transcriptómica.

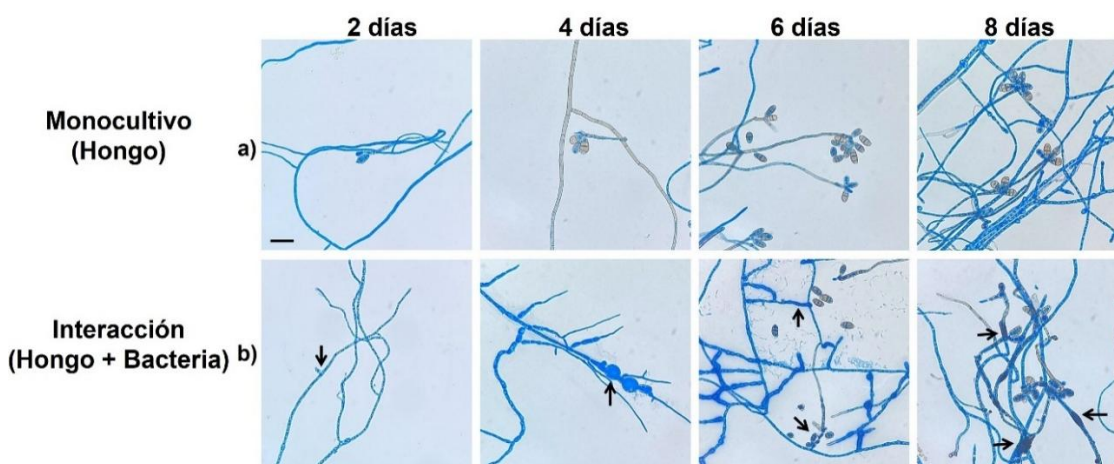


Figura 1. Interacción directa de *Bacillus licheniformis* M2-7 y *Curvularia lunata* SY17.

a) Monocultivo de *C. lunata* SY17 donde se aprecia crecimiento normal en medio LB líquido durante los días de observación. b) Interacción directa de *C. lunata* SY17 y *B. licheniformis* M2-7 en medio LB líquido. Fotografías tomadas con el objetivo de 40X de un microscopio óptico Olympus. Las flechas indican hinchamiento, deformidad, ruptura de hifa, deformidad de conidios y reducción de esporas.

Perfil transcriptómico de *Bacillus licheniformis* M2-7 interaccionando con *Curvularia lunata* SY17.

Se realizó un análisis comparativo del transcriptoma de las de las células de la cepa bacteriana en presencia y ausencia del hongo fitopatógeno. Se determinó la calidad de las secuencias de

los transcritos, y se observó que alcanzaron valores de Q30 (94.31-95.14%), indicando que las lecturas son perfectas, con pocos errores y ambigüedades (Tabla 1).

Tabla 1. Calidad de los datos de secuenciación en el programa fastp.

Muestra	Lecturas brutas	Lecturas limpias	Bases limpias	Q30 (%) *	Contenido de GC (%)
B1_S20	15196322	14556890	1104043	94.88	50.89
B2_S21	11776932	11287602	856841455	94.31	50.14
B3_S22	20242822	19227448	1458811	95.14	51.78
BC1_S23	14366210	13711022	1040516	94.99	51.12
BC2_S24	14517662	13877424	1053282	95.13	50.50
BC3_S25	16828802	16141106	1224084	94.84	51.36

*Índice de Phred.

La interacción de *B. licheniformis* M2-7 con *C. lunata* SY17 dió como resultado 35 GED. De estos genes, 32 estaban significativamente regulados positivamente, mientras que 2 genes estaban significativamente regulados negativamente (Figura 2).

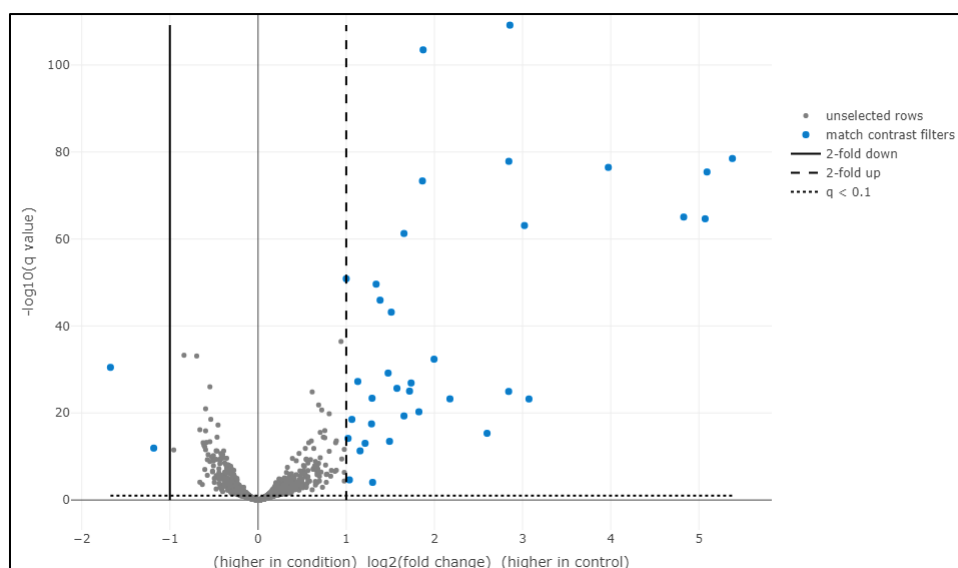


Figura 2. Gráfico de volcán del patrón de expresión génica en *B. licheniformis* M2-7 en interacción con *C. lunata* SY17. Los puntos de izquierda a derecha representan genes regulados negativamente, genes sin diferencia en la expresión y genes regulados positivamente, respectivamente. Un gen se consideró diferencialmente expresado si tenía un Log2 fold change >1 y un FDR de 0.95 con valores de p ajustados ≤ 0.05 .

Los genes regulados positivamente se asociaron a la pared de esporas y la germinación de esporas (Tabla 2).

Tabla 2. Genes de *Bacillus licheniformis* M2-7 con una expresión diferencial significativa durante la interacción directa con *Curvularia lunata* SY17.

Identificador	Gen	Proteína	Valor de <i>fold change</i>
gene-GII88_00310	<i>sspF</i>	SspF	3.971881
gene-GII88_04415			1.47542
gene-GII88_04775	<i>yfhD</i>	YfhD	1.718719
gene-GII88_04805	<i>ypzG</i>	YpzG	2.17782
gene-GII88_04810	<i>sspK</i>	Proteína de espora soluble en ácido	1.821864
gene-GII88_04860	<i>sspE</i>	Proteína de espora soluble en ácido	4.827544
gene-GII88_05280	<i>yhcV</i>	YvcV	1.736119
gene-GII88_05610	<i>sspB</i>	Proteína B de esporas soluble en ácido	2.597892
gene-GII88_05650	BLi01058		1.038175
gene-GII88_05865	BL05233	Proteína de la cubierta de la espora	3.072062
gene-GII88_06400	<i>yizC</i>	YizC	1.492087
gene-GII88_06755	<i>cotY</i>	Proteína Y de la cubierta de la espora	1.654774
gene-GII88_06760	<i>cotX</i>	Proteína X de la cubierta de la espora	1.38673
gene-GII88_06765	<i>cotW</i>	Proteína W de la cubierta de la espora	1.871895
gene-GII88_06790	<i>spoVIF</i>	Factor de transcripción específico de la esporulación	1.131909
gene-GII88_08195	<i>yzkV</i>	Proteína de la membrana	1.213372
gene-GII88_08845	<i>yloV</i>	Proteína glicerona cinasa	1.023919
gene-GII88_11030	BL01387	Proteína de la cubierta de la espora	1.337367
gene-GII88_11205	<i>gerT</i>	Proteína de la germinación de espora	1.864305
gene-GII88_14165	BL03704		1.996915
gene-GII88_15085	<i>yrzI</i>	YrzI	1.28765
gene-GII88_15185	<i>yrzQ</i>	YrzQ	1.292
gene-GII88_15190	<i>yrzR</i>	YrzR	2.84173
gene-GII88_15195	<i>yrzD</i>	YrzD	2.843856
gene-GII88_15375	<i>coxA</i>	Proteína de la corteza de esporulación CoxA	3.021831
gene-GII88_15770	<i>gerE</i>	Proteína de la germinación de espora	1.062575
gene-GII88_16320	<i>sspB</i>	Proteína de espora soluble en ácido	5.379358
gene-GII88_18105	BL05329	Proteína de la cubierta de la espora	1.160169

gene-GII88_18225	<i>liaS</i>	LiaS	1.509065
gene-GII88_18230	<i>liaF</i>	LiaF	1.575075
gene-GII88_18235	<i>liaG</i>	LiaG	2.856541
gene-GII88_18240	<i>liaH</i>	LiaH	5.069728
gene-GII88_18245	<i>liaI</i>	LiaI	5.091014
gene-GII88_18485	<i>mntA</i>	Proteína de sistema de transporte de manganeso	1.657492
gene-GII88_20050	<i>ssb</i>		1.30106

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Previamente se demostró que *Bacillus licheniformis* M2-7 inhibe el crecimiento de *Curvularia lunata* SY17 (Bolaños-Dircio et al., 2023), lo que demuestra el potencial de esta cepa como candidata a control biológico. Nuestros resultados mostraron que *B. licheniformis* M2-7 provocó severos daños morfológicos en hifas, conidios y esporas de *C. lunata* SY17 (Fig. 1). El efecto antifúngico de las especies de *Bacillus* suele estar asociado a la secreción de metabolitos que provocan daños a la membrana plasmática y a la pared celular de varios hongos fitopatógenos (Blake et al., 2021; Soni y Kaheria, 2021; Zhang et al., 2023). En un estudio previo detectamos que *Bacillus licheniformis* M2-7 tiene la capacidad de producir enzimas líticas, sideróforos, biosurfactantes y compuestos orgánicos volátiles (COVs), por lo que podemos inferir que la capacidad antifúngica de esta cepa se debe a alguno de estos compuestos (Bolaños-Dircio et al., 2021).

Las especies del género *Bacillus* tienen la capacidad de esporular en ambientes de poca disponibilidad de nutrientes (Galperin, 2013; Toukabri et al., 2023). Sin embargo, la spora está equipada para monitorear su entorno y reanuda rápidamente su crecimiento vegetativo cuando se expone a nutrientes en el proceso conocido como germinación (Galperin et al., 2022). Durante la interacción entre *Bacillus licheniformis* M2-7 y *Curvularia lunata* SY17 se determinaron genes expresados diferencialmente (GED) relacionados con la pared y la germinación de esporas de la bacteria (Tabla 2). Tres genes que estaban regulados positivamente durante la interacción codifican para las proteínas CotY, CotX y CotW, proteínas de la cubierta de la corteza de las esporas relacionadas con las etapas IV y V de la esporulación siendo las últimas proteínas morfológicamente expresadas (McKenney et al., 2010; Tu et al., 2021). Otros genes diferencialmente expresados son los genes *sspF*, *sspK*,

sspE y *sspB* que codifican para proteínas de esporas pequeñas y solubles en ácido. Estas proteínas se encuentran exclusivamente en el núcleo de las esporas, donde saturan el ADN de las esporas. La unión de las proteínas altera drásticamente la estructura y las propiedades del ADN, y estas proteínas son factores importantes en la resistencia de las esporas al calor y muchas sustancias químicas (Tu et al., 2021). También el gen *gerT* se observó diferencialmente expresado durante la interacción, éste participa en la germinación de esporas de cepas como *B. subtilis*. Liang et al. (2023) reportaron que la asociación de *Bacillus velezensis* E68 con *Fusarium graminearum* DAOMC 180378, provocó la sobre expresión de genes relacionados con las etapas II, III, IV y V de la esporulación. Los genes regulados codifican para proteínas de la membrana, factores sigma, proteínas reguladoras, proteínas relacionadas con el engullimiento de la membrana y proteínas del cortex de la espora, concluyendo que la presencia del hongo fitopatógeno promueve el proceso de esporulación de *B. velezensis* simplemente en respuesta a un estrés.

Las esporas de algunas especies del género *Bacillus* son eficientes en el control de plagas de insectos (Álvarez-Lagazzi et al., 2021; Dubovskiy et al., 2021). Sin embargo, existen pocos reportes sobre la relación del proceso de esporulación y las esporas de las especies del género *Bacillus* y su efecto antagónico contra hongos fitopatógenos. Savluchinske et al. (2004) reportaron que la esporulación de *Bacillus subtilis* estaba relacionada con la producción de metabolitos activos. Estos metabolitos mostraron efectos antifúngicos en diferentes grupos taxonómicos contaminantes de la superficie de la madera (*Cladosporium cucumerium*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium expansum*). Ben et al. (2012) reportaron que el sobrenadante del cultivo de esporas de *Bacillus subtilis* L194 mostró una actividad antifúngica dos veces mayor que las células vegetativas contra el hongo fitopatógeno *Phoma medicaginis*. *In vivo*, las esporas de L194 fueron altamente protectoras contra *P. medicaginis* al reducir los síntomas de la enfermedad en plántulas de *Medicago truncatula*.

Hasta ahora no hay reportes que establezcan los sistemas moleculares y genéticos de la cepa M2-7 durante la interacción con *Curvularia lunata* que esclarezcan los mecanismos de antagonismo, por lo que el vínculo entre la producción de compuestos antifúngicos y la esporulación puede ser objeto de estudios futuros.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkhalek A, Al-Askar AA, Behiry SI (2020) *Bacillus licheniformis* strain POT1 mediated polyphenol biosynthetic pathways genes activation and systemic resistance in patato plants against Alfafa mosaic virus. Sci Rep 10: 16120. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72676-2>
- Ahmad Z, Wu J, Chen L, Dong W (2017) Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. Sci Rep 7: 1777. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01940-9>
- Akonda MMR, Yasmin M, Hossain I (2015) Study on etiology, incidence and severity of Southern corn leaf blight, curvularia leaf spot, sheath blight and damping off of maize. Int J Biosci 7: 111-117. <https://doi.org/10.12692/ijb/7.6.111-117>
- Álvarez-Lagazzi AP, Cabrera N, Francis F, Ramírez CC (2021) *Bacillus subtilis* (Bacillales, Bacillaceae) spores affect survival and population growth in the grain *Sitobion avenae* (Hemiptera, Aphididae) in relation to the presence of the facultative bacterial endosymbiont *Regiella insecticola* (Enterobacteriales, Enterobacteriaceae). J Econ Entomol 114: 2043-2050. <https://doi.org/10.1093/jee/toab164>
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11: R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>
- Bahena-Oregón R, Rodríguez-Barrera MA, Rosas-Guerrero V, Méndez Bahena A, Toledo-Hernández E, Toribio-Jiménez J, Navez-González D, Palemón-Alberto F, Ortega-Acosta SA, Romero-Ramírez Y (2022) Chapter 8.3. *Bacillus licheniformis* M2-7 inhibits the growth and affects the structure of phytopathogenic fungi of *Zea mays*. En: Ambiente y Bioenergía. Perspectivas y avances de la sostenibilidad (ABIAER A.C., Ed.). México City, México, pp. 500-508.
- Barupal T, Meena M, Sharma K (2021) Comparative analysis of bioformulations against *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn causing leaf spot disease of maize. Arch Phytopathol Plant Prot 54: 261-272. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1827657>
- Ben Slimene I, Tabbene O, Djebali N, Cosette P, Schmitter JM, Jouenne T, Urdaci MC, Limam F (2012) Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. Res Microbiol 163: 388-397. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.03.004>

Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol* 35: 1044-1051. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600020>

Bhai RS, Prameela TP, Vincy K, Biju CN, Srinivasan V, Babu KN (2019) Soil solarization and amelioration with calcium chloride or *Bacillus licheniformis*- An effective strategy for the management of bacterial wilt of ginger by *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Eur J Plant Pathol* 154: 903-917. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01709-y>

Blake C, Chrisensen MN, Kovacs AT (2021) Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Mol Plant Microbe Interact* 34: 15-25. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR>

Bolaños-Dircio A, Segura D, Toribio-Jiménez J, Toledo-Hernández E, Ortuño-Pineda C, Ortega-Acosta SÁ, Palemón-Alberto F, Romero-Ramírez Y (2022) Cysts and alkylresorcinols of *Azotobacter vinelandii* inhibit the growth of phytopathogenic fungi. *Chil J Agric Res* 82: 658-662. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392022999499658>

Bolaños-Dircio A, Toribio-Jiménez J, Rodríguez-Barrera MA, Hernández-Flores G, Toledo-Hernández E, Palemón-Alberto F, Romero-Ramírez Y (2021) *Bacillus licheniformis* M2-7 improves the growth and performance of *Capsicum annuum* L. *Agrociencias* 55: 227-242. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i3.2415>

Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* (Oxford, England) 34: i884-i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

Chu Y, Corey DR (2012) RNA sequencing: platform selection, experimental design, and data interpretation. *Nucleic Acid Ther* 22: 271-274. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0367>

Constanza CL, Cosuelo SL, Cuervo PJ, Joya AJ, Marquez K (2012) Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *NOVA* 10: 64-82. <https://doi.org/10.22490/24629448.518>

Cristóbal-Alejo J, Navarrete-Mapen Z, Herrera-Parra E, Mis-Mut M, Tun-Suárez JM, Ruíz-Sánchez E (2013) Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: Identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Revista de protección vegetal* 28: 138-144.

Damm K, Bach S, Müller KMH, Klug G, Burenina OY, Kubareva EA, Grünweller A, Hartmann RK (2015) Impact of RNA isolation protocols on RNA detection by northern blotting. *Methods Mol Biol* 1296: 29–38. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2547-6_4

Domínguez-Escobar J, Wolf D, Fritz G, Höfler C, Wedlich-Söldner R, Mascher T (2014) Subcellular localization, interactions and dynamics of the phage-sochk protein-like Lia response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 92. <https://doi.org/10.1111/mmi.12586>

Dubovskiy IM, Grizanov EV, Tereshchenko D, Krytsyna TI, Alikina T, Kalmykova G, Kabilov M, Coates CJ (2021) *Bacillus thuringiensis* spores and Cry3A toxins synergistically expedite colorado potato beetle mortality. *Toxins* 13: 746. <https://doi.org/10.3390/toxins13110746>

Dunlap CA, Schisler DA, Bowman MJ, Rooney AP (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. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2015.03.002>

Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol* 285: 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

Galperin MY (2013) Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*. *Microbiol Spectr* 1: TBS-0015-2012-. <https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012>

Galperin MY, Yutin N, Wolf YI, Vera Alvarez R, Kooning EV (2022) Conservation and evolution of the sporulation gene set in diverse members of the *Firmicutes*. *J Bacteriol* 204: e0007922. <https://doi.org/10.1128/jb.00079-22>

Hao JC, Feng YX, Dan MD, Jie LZ, Ye YB, Zheng Y, Jun QY, Hua GJ (2019) Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* F21 against *Fusarium* wilt on watermelon. *Front Microbiol* 10: 652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00652>

Jani S, Sterzenbach K, Adatrao V, Tajbakhsh G, Mascher T, Golemi-Kotra D (2020) Low phosphatase activity of LiaS and strong LiaR-DNA affinity explain the unusual LiaS to LiaR in vivo stoichiometry. *BMC Microbiol* 20: 104. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01796-6>

- Lefort F, Calmin G, Pelleteret P, Farinelli L, Osteras M, Crovadore J (2014) Whole-genome shotgun sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* strain UASWS BA1, a bacterium antagonistic to plant pathogenic fungi. *Genome Announc* 2: e00016-00020. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00016-14>
- Liang N, Charron JB, Jabaji S (2023) Comparative transcriptome analysis reveals the biocontrol mechanism of *Bacillus velezensis* E68 against *Fusarium graminearum* DAOMC 180378, the causal agent of Fusarium head blight. *PLoS One* 18: e0277983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277983>
- Márquez GME, Torres SLA, Escobar HM (2003) Evaluación del efecto nematicida de cepas de *Bacillus* spp. *Fitosanidad* 7: 55-58.
- McKenney PT, Dirks A, Eskandarian HA, Grabowski P, Guberman J, Wang KH, Gitai Z, Eichenberger P (2010) A distance-weighted interaction map reveals a previously uncharacterized layer of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Curr Biol* 20: 934-938. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03060>
- Miljakovic D, Marinkovic J, Balesevic S (2020) The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* 8: 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Mnif I, Ghribi D (2015) Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. *Crop Prot* 77:52-64. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.017>
- Panichikkal J, Puthiyattil N, Raveendran A, Nair RA, Krishnankutty RE (2021) Application of encapsulated *Bacillus licheniformis* supplemented with chitosan nanoparticles and rice starch for the control of *Sclerotium rolfsii* in *Capsicum annuum* (L.) seedlings. *Curr Microbiol* 78: 911-919. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02361-8>
- Romero Y, Guzmán J, Moreno S, Cocotl-Yañez M, Vences-Guzmán MÁ, Castañeda M (2016) The GacS/A-RsmA signal transduction pathway controls the synthesis of alkylresorcinol lipids that replace membrane phospholipids during encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS One* 11: e0153266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153266>

Savluchinske FS, Barbosa A, Cabrita M, Nunes L, Esteves A, Roseiro JC, Marcelo CMJ (2004) Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. J Ind Microbiol Biotechnol 31: 199-203. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0133-x>

Shi-gang G, Xuan N, Ying-ying L, Ke-he F, Chuan-jin Y, Jin-xin G, Meng W, Ya-qian L, Jie C (2017) Sod gene of *Curvularia lunata* is associated with the virulence in maize leaf. J Integr Agric 16: 874-883. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61513-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61513-7)

Soni R, Keharia H (2021) Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming Bacilli. Planta 254: 49. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03695-0>

Syed Ab Rahman SF, Singh E, Pieterse CMJ, Schenk PM (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. Plant Sci 267: 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>

Thurotte A, Brüser T, Mascher T, Schneider D (2017) Membrane chaperoning by members of the PspA/IM30 protein family. Commun Integr Biol 10 <https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1264546>

Toukabri H, Lereclus D, Slamti L (2023) A sporulation-independent way of life for *Bacillus thuringiensis* in the late stages of infection. mBio, 14: e0037123. <https://doi.org/10.1128/mbio.00371-23>

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol 28: 511-515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>

Tu Z, Dekker HL, Roseboom W, Swarge BN, Setlow P, Brul S, Kramer G (2021) High resolution analysis of proteome dynamics during *Bacillus subtilis* sporulation. Int J Mol Sci 22: 9345. <https://doi.org/10.3390/ijms22179345>

Upadhyay A, Mohan S (2021) *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from *Heterorhabditis indica* infected apple root borer (*Dorycthenes huegelii*) suppresses nematode production in *Galleria mellonella*. Acta Parasitolo 66: 989-996. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00366-8>

- Van-Verk M, Hickman R, Pieterse C, Van-Wees S (2013) RNA-Seq: revelation of the messengers. *Trends Plant Sci* 18:175-179. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.001>
- Wilhelm BT, Landry JR (2009) RNA-seq quantitative measurement of expresión through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 48: 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.016>
- Won SJ, Moon JH, Ajuna HB, Choi SI, Maung CEH, Lee S (2021) Biological control of leaf blight disease caused by *Pestalotiopsis maculans* and growth promotion of *Quercus acutissima* Carruth container seedlings using *Bacillus vazezensis* CE 100. *Int J. Mol. Sci* 22: 11296. <https://doi.org/10.3390/ijms222011296>
- Zhang D, Quiang R, Zhou Z, Pan Y, Yu S, Yuan W, Cheng J, Wang J, Zhu J, Yang Z (2022) Biocontrol and action mechanism of *Bacillus subtilis* lipopeptides fengycins against *Alternaria solani* in patato as assessed by transcriptome analysis. *Front Microbiol* 13: 861113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.861113>
- Zhang D, Wang F, Zhao J, Sun J, Fu D, Liu K, Chen N, Li G, Xiao S, Xue C (2019) Virulence, molecular diversity, and mating type of *Curvularia lunata* in China. *Plant Dis* 103: 1728-1737. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03013>
- Zhang J, Zhu W, Goodwin PH, Lin Q, Xia M, Xu W, Sun R, Liang J, Wu C, Li H, Wang Q, Yang L (2022) Response of *Fusarium pseduograminearum* to biocontrol agent *Bacillus vazezensis* YB-185 by phenotypic and transcriptome analysis. *J Fungi* 8: 763. <https://doi.org/10.3390/jof8080763>
- Zhang N, Yang D, Wang D, Miao Y, Shao J, Zhou X, Xu Z, Li Q, Feng H, Li S, Shen Q, Zhang R (2015) Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize by maize exudates. *BMC Genom* 16: 685. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1825-5>