



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de química**

Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. obtenidos de semillas de  
*Capsicum* spp. y su uso potencial para el control de hongos  
fitopatógenos

Tesis

Que como parte de los requisitos

para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

IBQ. Merle Ariadna Espinosa Bernal

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Querétaro, Qro. a agosto del 2024

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. obtenidos de semillas de  
*Capsicum* spp. y su uso potencial para el control de hongos  
fitopatógenos

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental**

Presenta

**IBQ. Merle Ariadna Espinosa Bernal**

Dirigido por:

**Dr. Juan Campos Guillén**

Dr. Juan Campos Guillén

Presidente

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Secretario

Dr. Miguel Angel Ramos López

Vocal

Dr. Víctor Pérez Moreno

Suplente 1

M. en C. Erika Beatriz Álvarez Hidalgo

Suplente 2

Querétaro, Qro.

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Agosto del 2024

México

## **DEDICATORIA**

La presente tesis, esta dedicada a mis padres quienes me han brindado su apoyo y motivación incondicional de manera constante.

También dedico la tesis, a mis hermanos; Osmar y Giovanni, quienes son parte importante de este gran logro y que siempre han sido para mi una fuente de inspiración y motivación para alcanzar mis metas, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), ya que, sin el apoyo económico otorgado, no habría sido posible la realización del proyecto de investigación.

Le agradezco al Dr. Juan Campos Guillén, por haberme dado la confianza y oportunidad para realizar este proyecto de investigación, de brindarme su constante apoyo, paciencia y disponibilidad, así como de compartir sus conocimientos.

Al químico George, quién fue mi guía y apoyo en las actividades experimentales, por estar al pendiente de los estudiantes y de fomentar un entorno alegre dentro del laboratorio.

A la M. en C. Erika Álvarez H., quién me asesoró y me brindó su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A los integrantes del comité; Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar, Dr. Miguel Angel Ramos Lopez y al Dr. Víctor Pérez Moreno, quienes dieron sus aportaciones al proyecto de investigación.

A mis amigos y compañeros de posgrado; en particular, a Carlos Chan y Mayra Mena, quienes me apoyaron y motivaron en mis peores momentos, pasamos por experiencias agradables y divertidas durante este tiempo que convivimos juntos, les expreso mi gratitud por su paciencia, compañía, enseñanza y aprendizaje.

A mi colega y amiga Lucero, quién todo este tiempo me ha animado a alcanzar mis metas con mucho entusiasmo, por ser mi consejera y mi apoyo incondicional cuando lo necesitaba.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURA Y SIGLAS .....	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
2.1.- Chile ( <i>Capsicum</i> spp.) y su importancia económica.....	3
2.2. Hongos fitopatógenos que afectan a las hortalizas .....	4
2.2.1. <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	5
2.2.2. <i>Alternaria alternata</i> .....	6
2.2.3. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	7
2.2.4. <i>Rhizoctonia solani</i> .....	8
2.2.5. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	10
2.2.6. <i>Sclerotinia</i> sp.....	11
2.3.- Métodos de control biológico contra hongos fitopatógenos .....	11
2.3.1 Producción de moléculas antibióticas .....	13
2.3.2 Enzimas hidrolíticas .....	14
2.3.3 Inducción de mecanismos de defensa del huésped.....	15
2.3.4 Competencia por espacio y nutrientes .....	15
2.3.5 Compuestos orgánicos volátiles (COV).....	16
2.4.- Importancia sobre la caracterización de bacterias aisladas en semillas	17

2.5. Importancia del género de <i>Bacillus</i> .....	19
2.5.1.- <i>Bacillus</i> asociados a semillas de algunas hortalizas .....	21
2.7.- Especies del género <i>Bacillus</i> asociados a semillas de <i>Capsicum</i> .....	22
2.8. Compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por bacterias del género <i>Bacillus</i> .....	24
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 General .....	27
4.2 Específicos .....	27
5. METODOLOGÍA .....	28
5.1 Obtención de cepas de hongos fitopatógenos .....	28
5.2 Aislamiento de bacterias a partir de semillas de <i>Capsicum</i> spp.....	28
5.3. Evaluación antifúngica <i>in vitro</i> de las bacterias aisladas en consorcio bacteriano .....	29
5.4. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los aislados bacterianos seleccionados .....	29
5.5. Extracción de ADN y secuenciación completa del genoma de las bacterias seleccionadas.....	30
5.6. Prueba de sensibilidad a antibióticos .....	31
5.7. Extracción de los compuestos orgánicos volátiles (COV) .....	31
5.8. Análisis de COV mediante la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplado con cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) .....	32
5.9. Análisis estadísticos .....	33
6. RESULTADOS.....	34

6.1. Aislamiento de bacterias de semillas de <i>Capsicum</i> spp.....	34
6.2. Actividad antifúngica de los aislados bacterianos en consorcio .....	35
6.3. Evaluación de los aislados antagonistas seleccionados contra hongos fitopatógenos .....	36
6.4. Identificación de los aislados bacterianos .....	39
6.5. Análisis genómico de <i>B. altitudinis</i> y <i>B. tropicus</i> .....	41
6.5.1. Descripción genómico y subsistemas de <i>B. altitudinis</i> CH05 .....	41
6.5.2 Descripción del genoma y subsistemas de <i>B. tropicus</i> CH13 .....	44
6.6. Identificación de genes que otorgan resistencia a antibióticos y virulencia de <i>B. altitudinis</i> y <i>B. tropicus</i> .....	47
6.7. Identificación de genes implicadas en la síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol.....	51
6.8 Análisis e identificación de compuestos orgánicos volátiles (COV).....	51
6.8.1 Caracterización de los COV producidos por <i>B. altitudinis</i> CH05 .....	51
6.8.2 Caracterización de los COV producidos por <i>B. tropicus</i> CH13 .....	54
7. DISCUSIÓN .....	58
8. CONCLUSIONES .....	64
10. REFERENCIAS .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislados bacterianos obtenidos de semillas de <i>Capsicum</i> spp. ....	34
Tabla 2. Actividad antagonista de los aislamientos bacterianos en consorcio hacia <i>S. rolfssi</i> . ....	36
Tabla 3. Características generales del genoma de <i>B. altitudinis</i> CH05. ....	42
Tabla 4. Características generales del genoma de <i>B. tropicus</i> CH13. ....	45
Tabla 5. Identificación de genes de resistencia a antibióticos hallados en el genoma de <i>B. altitudinis</i> CH05. ....	48
Tabla 6. Lista de genes de resistencia a antibióticos identificados en el genoma de <i>B. tropicus</i> CH13. ....	49
Tabla 7. Genes relacionados a la virulencia que contiene <i>B. tropicus</i> CH13 identificados por la fuente de VDFB. ....	50
Tabla 8. COV producidos por <i>B. altitudinis</i> CH05 detectados por HS-SPME-GC-MS. ....	51
Tabla 9. COV producidos por <i>B. tropicus</i> CH13 detectados mediante HS-SPME-CG-MS. ....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo del chile serrano ( <i>C. annum</i> L.) originario de México (Calderón Coss, 2024).....	3
Figura 2. Producción de chile manzano ( <i>Capsicum pubescens</i> R & P) en el estado de Michoacán (Fuente propia). ....	4
Figura 3. Patogenicidad de <i>S. rolfsii</i> . ....	5
Figura 4. Micrografía de conidios de <i>A. alternata</i> .....	6
Figura 5. Actividad patógena de <i>A. alternata</i> .....	7
Figura 6. Observación microscópica de <i>F. oxysporum</i> . ....	7
Figura 7. Efecto fitopatógeno del hongo <i>F. oxysporum</i> .....	8
Figura 8. Estructura morfológica de <i>R. solani</i> .....	9
Figura 9. Síntomas ocasionados por <i>R. solani</i> .....	9
Figura 10. Micrografía de las conidias de <i>C. gloeosporioides</i> .....	10
Figura 11. Efecto patogénico de <i>Colletotrichum</i> spp.....	11
Figura 12. Diversos mecanismos de acción que poseen los microorganismos benéficos para el biocontrol de un hongo fitopatógeno.....	13
Figura 13. Actividad antagonista de diez aislados bacterianos contra <i>S. rolfsii</i> .....	37
Figura 14. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del aislado CH05.....	38
Figura 15. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> del aislado CH13.....	39
Figura 16. Análisis filogenético de <i>B. altitudinis</i> CH05 mediante el uso de la plataforma BV-BRC.....	40
Figura 17. Análisis filogenético para <i>B. tropicus</i> CH13 mediante el uso de la plataforma BV-BRC.....	41
Figura 18. Representación del mapa genómico circular y distribución de los subsistemas de <i>B. altitudinis</i> CH05.....	43
Figura 19. Clasificación de los subsistemas por categoría.....	44
Figura 20. Representación del mapa genómico circular y distribución de los subsistemas de <i>B. tropicus</i> CH13.....	46

Figura 21. Conteo de los subsistemas por categoría.....	47
Figura 22. Perfil cromatográfico de los COV producidos por <i>B. altitudinis</i> CH05...	54
Figura 23. Perfil cromatográfico de los COV producidos por <i>B. tropicus</i> CH13. ....	57

## ABREVIATURA Y SIGLAS

AMPPs - [Antimicrobial peptides and protein - Proteínas y péptidos antimicrobianas]

BV-BRC - [Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center - Plataforma bioinformática bacteriana y viral]

CARD - [Comprehensive Antibiotic Resistance Database - Base de datos completa sobre resistencia a los antibióticos]

CDS - [Protein coding sequences - Secuencias de proteínas codificantes]

GRAS - [Generally Recognized as Safe - Generalmente reconocida como seguros]

mVOCs - [microbial volatile organic compounds - Compuestos orgánicos volátiles microbianos]

MUSCLE - [multiple sequence comparison by log-expectation - Comparación de secuencias múltiples por expectativa logarítmica]

NDARO - [National Database of Antibiotic Resistant Organisms - Base de datos nacional de organismos resistentes a los antibióticos]

NRPs - [Nonribosomal peptide synthases] - Péptidos de síntesis no-ribosomales]

PATRIC - [the PATHosystems Resource Integration Center - El Centro de integración de recursos de PATHosystems]

PGFams - [ familias de proteínas globales]

RAST - [Rapid Annotation using Subsystem Technology - Anotación rápida utilizando tecnología de subsistema]

RAxML - [Randomized Axelerated Maximum Likelihood - Máxima probabilidad axelerada aleatoria]

TCDB - [Transporter Classification Database - Base de datos de clasificación de transportadores]

VFDB - [Virulence Factor Database - Base de datos de factores de virulencia]

## RESUMEN

Las bacterias de *Bacillus* asociadas a semillas de algunas hortalizas de importancia económica han sido de particular interés debido a sus diversas funciones ecológicas como la capacidad de modular el desarrollo de la planta, resistencia a factores abióticos y bióticos, y producción de compuestos antifúngicos. Sin embargo, los estudios sobre la caracterización de bacterias en semillas de *Capsicum* ha sido limitado. El objetivo de este trabajo fue obtener aislados de *Bacillus* en semillas de *Capsicum* spp. y evaluar su actividad antifúngica mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV). Se obtuvieron setenta y seis aislados y dos de ellos exhibieron mayor efecto inhibitorio micelial mediante un ensayo de doble placa. El aislado CH05 demostró inhibición micelial contra *Sclerotinia* sp. (90.83%), *Rhizoctonia solani* (79.58%) y *Alternaria alternata* (75.46%), mientras que CH13 inhibió a *Sclerotinia* sp. (91.25%), *Rhizoctonia solani* (80.83%) y *Sclerotium rolfsii* (71.25%). Basado en una caracterización genómica, los aislados se identificaron como *Bacillus altitudinis* CH05 y *Bacillus tropicus* CH13 por BV-BRC. El tamaño del genoma de *B. altitudinis* CH05 fue de 3.69 Mbp, con un contenido GC promedio de 41.25% y 40 genes de resistencia a antibióticos. *B. tropicus* CH13, el tamaño de su genoma fue de 5.28 Mbp, contenido GC promedio de 35.24%, 48 genes de resistencia a antibióticos e incluyendo genes de virulencia. El análisis de HC-SPME-SM-CG detectó algunos compuestos mayoritarios producidos por ambas cepas; 2,5-dimetilpirazina, acetoína, 2,3-butanodiona, ácido nonanoico y 1-butanol, entre otros. Los hallazgos en esta investigación, prueban que las bacterias asociadas a semillas de *Capsicum*, tienen potencial para inhibir el crecimiento de hongos patógenos mediante la producción de COV y su posible aplicación dentro del sector agrícola como agentes de biocontrol.

**Palabras clave:** *Bacillus altitudinis* CH05, *Bacillus tropicus* CH13, semillas de *Capsicum*, hongos fitopatógenos, secuenciación del genoma, biocontrol, compuestos orgánicos volátiles (COV)

## ABSTRACT

*Bacillus* bacteria associated with seeds of some economically important vegetables have been of particular interest due to their diverse ecological functions such as the ability to modulate plant development, resistance to abiotic and biotic factors, and production of antifungal compounds. However, studies on bacteria characterization in *Capsicum* seeds have been limited. The objective of this work was to obtain *Bacillus* isolates from seeds of *Capsicum* spp. and evaluate its antifungal activity through the production of volatile organic compounds (VOCs). Seventy-six isolates were obtained and two of them exhibited a greater mycelial inhibitory effect using a double plate assay. Isolate CH05 demonstrated mycelial inhibition against *Sclerotinia* sp. (90.83%), *Rhizoctonia solani* (79.58%) and *Alternaria alternata* (75.46%), while CH13 inhibited *Sclerotinia* sp. (91.25%), *Rhizoctonia solani* (80.83%) and *Sclerotium rolfsii* (71.25%). Based on genomic characterization, the isolates were identified as *Bacillus altitudinis* CH05 and *Bacillus tropicus* CH13 by BV-BRC. The genome size of *B. altitudinis* CH05 was 3.69 Mbp, with an average GC content of 41.25% and 40 antibiotic resistance genes. *B. tropicus* CH13, its genome size was 5.28 Mbp, average GC content of 35.24%, 48 antibiotic resistance genes and including virulence genes. The HC-SPME-SM-CG analysis detected some major compounds produced by both strains; 2,5-dimethylpyrazine, acetoin, 2,3-butanedione, nonanoic acid and 1-butanol, among others. The findings in this research prove that bacteria associated with *Capsicum* seeds have the potential to inhibit the growth of pathogenic fungi through the production of VOCs and their possible application within the agricultural sector as biocontrol agents.

**Keywords:** *Bacillus altitudinis* CH05, *Bacillus tropicus* CH13, *Capsicum* seeds, phytopathogenic fungi, genome sequencing, biocontrol, volatile organic compounds (VOCs)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. S. S.', is written below the text box. The signature is stylized and includes a long horizontal stroke at the bottom.

## 1.- INTRODUCCIÓN

De acuerdo a Valenzuela Ruiz y col. (2020), para el año 2050, el sector agrícola deberá incrementar su productividad entre un 70 y 100% con el objetivo de lograr satisfacer la demanda de alimentos alrededor del mundo que, para entonces, se estima habrá una población total de 10 mil millones de personas. Uno de los principales desafíos que enfrenta la agricultura, es el manejo y surgimiento de plagas y enfermedades. Tradicionalmente, el uso de fungicidas sintéticos se ha visto como la opción más viable para el control de hongos fitopatógenos que afectan a la mayoría de los cultivos económicamente importantes. Sin embargo, el uso excesivo de estos fungicidas sintéticos ha provocado efectos adversos como la contaminación del suelo y agua, la pérdida de biodiversidad y daños a la salud humana, entre otros. Por ello, ha surgido la necesidad de desarrollar e implementar nuevas alternativas biológicas y sustentables al ambiente.

En relación a esto, existen evidencias sobre el aislamiento y caracterización de bacterias del género *Bacillus* en semillas de diversas plantas medicinales, frutales y hortalizas que cumplen una función esencial en la producción agrícola. Además, se sabe que estas bacterias promueven el crecimiento de la planta, tolerancia ante factores de estrés abiótico y biótico, y producción de compuestos antifúngicos como enzimas, lipopéptidos y compuestos orgánicos volátiles (COV). No obstante, hay poca información sobre el estudio de bacterias en semillas de chile (*Capsicum* spp.) con actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos. Entre los hongos fitopatógenos de mayor importancia agrícola y económica se encuentran: *Sclerotinia* sp., causante de la enfermedad Damping off y pudrición de raíces; *Rhizoctonia Solani*, que genera la enfermedad de la marchitez que afecta directamente a las plántulas; *Sclerotium rolfsii*, que causa pudrición del tallo y raíz, y marchitamiento por clorosis; *Alternaria alternata*, que provoca el tizón temprano; *Fusarium oxysporum*, causante de marchitez vascular; y *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de la antracnosis. Estos hongos disminuyen el

rendimiento y calidad de la producción de algunas hortalizas principales tales como; chile serrano (*Capsicum annuum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.).

En base a lo anterior, se propuso aislar e identificar bacterias presentes en semillas de *Capsicum* spp. y evaluar su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos mediante la producción de COV. A partir de semillas de chile serrano (*C. annuum* L.), se obtuvieron dos aislados bacterianos CH05 y CH13 con actividad antagonista. La colonia aislada CH05 evidenció efecto inhibitorio micelial hacia *Sclerotinia* sp. (90.8%), *R. solani* (79.58%) y *A. alternata* (75.46%). Mientras que el aislado CH13, fue más eficiente contra *Sclerotinia* sp. (91.25%), *R. solani* (80.83%) y *S. rolfsii* (71.25%). Ambos aislamientos fueron identificados como *Bacillus altitudinis* CH05 y *Bacillus tropicus* CH13 mediante la plataforma BV-BRC. Además, los análisis genómicos mostraron que el tamaño de *B. altitudinis* CH05 fue de 3,69 Kpb, 3, 894 secuencias de proteínas codificantes (CDS) y genes que otorgan resistencia a antibióticos. Por otra parte, el genoma de *B. tropicus* CH13 fue de 5, 28 Kpb, 5, 508 (CDS) y genes relacionados con la resistencia a antibióticos y virulencia. Entre los principales COV de mayor abundancia relativa (%) producidos por la cepa de *B. altitudinis* CH04, fueron; 2,5-dimetilpirazina, acetoína, ácido nonanoico, 3-metil-1-butanol, ácido 3-metilbutanoico, 3-etil-2,5-dimetil-pirazina, ácido n-decanoico, 2,3-butanodiona, etanol y benzaldehído. Y *B. tropicus* CH13, entre los COV más abundantes, fueron; acetoína, 2,5-dimetilpirazina, 2,3-butanodiona, ácido nonanoico, 1-pentanol y ácido octanoico. La mayoría de estos compuestos han sido reconocidos por su propiedades antifúngicas.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- Chile (*Capsicum* spp.) y su importancia económica

Uno de los principales productos agrícolas de mayor consumo a nivel nacional, es el chile (*Capsicum* spp.), el cual tiene múltiples usos dentro de la gastronomía, ya que puede utilizarse como un condimento o para sazonar los alimentos con el fin de otorgarles el sabor y picor deseado. Cabe añadir que su consumo aporta grandes beneficios a la salud gracias a su alto contenido de vitaminas A y C, y la presencia de minerales como el hierro, fósforo, potasio y calcio, los cuales favorecen un buen funcionamiento del sistema digestivo (Kazerooni *et al.*, 2021). Otro hecho importante en relación al consumo de *Capsicum*, es su producción que tiene un valor agregado significativo dentro del mercado nacional e internacional, generando ingresos para los productores dedicados al cultivo de esta hortaliza. Como ejemplo de ello, la producción del chile verde (Figura 1) fue de 3, 324, 260 t (SADER, 2020) y su valor se estimó de 34, 012, 000 millones de pesos (SIAP, 2021). Además, resaltar que Chihuahua se consideró como el principal productor de chile verde (*Capsicum annuum* L.), con una producción total de 723, 000 t, seguido por Sinaloa (648, 222 t), Zacatecas (458, 943 t), San Luis Potosí (327, 124), Sonora (223, 432 t) y Jalisco (189, 611 t) a nivel nacional (SADER, 2021).



**Figura 1.** Cultivo del chile serrano (*C. annuum* L.) originario de México (Calderón Coss, 2024).

Por otro lado, a nivel nacional se cultivan diferentes variedades de chile, tales como jalapeño, serrano, poblano, mirasol, chile de árbol, manzano, pimiento y guajillo, por mencionar los más comercializados (Figura 2). En México, *Capsicum* es considerado uno de los principales cultivos de gran importancia socioeconómica, sin embargo, su producción se ve afectado por diversas enfermedades provocadas principalmente por diferentes hongos fitopatógenos.



**Figura 2.** Producción de chile manzano (*Capsicum pubescens* R & P) en el estado de Michoacán (Fuente propia).

## **2.2. Hongos fitopatógenos que afectan a las hortalizas**

En general, el cultivo de hortalizas se ve afectado por diversos hongos patógenos que tienden a provocar diversas enfermedades lo cual, representa un obstáculo para el rendimiento, productividad y calidad de las hortalizas. Como dato adicional, el bajo rendimiento de producción de los cultivos a nivel mundial oscila alrededor de 14.4% anual debido a las enfermedades que causan los hongos y se estima pérdidas económicas por 220 billones de dólares. Entre los principales géneros de hongos conocidos, se incluyen; *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. En específico, la producción y el cultivo de *Capsicum* spp., se ve afectado principalmente por; *Colletotricum capsici*, *Phytophthora capsici*

L., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Alternaria alternata* de los más evidentes hasta ahora (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021). A continuación, se describen los hongos de mayor importancia agrícola que tienden a influir sobre el rendimiento de producción de algunas hortalizas.

**2.2.1. *Sclerotium rolfsii*.** Es un hongo que se caracteriza por ser saprófito, se considera un parásito facultativo, amplio rango de hospedador y generalmente se transmite a través del suelo. La reproducción de *S. rolfsii* ocurre de forma asexual al formar esclerocios esféricos de 0.5 a 1.5 mm de diámetro produciendo así, micelios blancos algodonosos (Figura 3). Además, debido a su estructura especial reproductiva asexual del hongo, la hace más difícil de prevenir y de controlar ya que permanece largos periodos de tiempo en el suelo (Jiménez-Pérez *et al.*, 2022; Shuckla *et al.*, 2022). El hongo infecta diversas plantas comestibles en todo el mundo, entre las que más se destacan son; *Solanum lycopersicum* L., *Cucumis sativus* L., *Capsicum annuum* L., *Zea mays* L., entre otros (Dwivedi y Prasad, 2016). Además, se sabe que *Sclerotium rolfsii* Sacc., causa algunas enfermedades tales como; podredumbre del cuello, la pudrición del tallo, marchitamiento por clorosis, tizón de las plántulas, tizón del tallo y pudrición de la raíz (Chen *et al.*, 2019).



**Figura 3. Patogenicidad de *S. rolfsii*.** Formación de micelios blancos en el tallo de *Solanum lycopersicum* L. (Shuckla *et al.*, 2022)

**2.2.2. *Alternaria alternata*.** Se caracteriza por ser un hongo fitopatógeno causante de varias enfermedades que afecta a algunos cultivos agrícolas, principalmente a *S. lycopersicum L.*, dañando sus hojas, tallos y frutos derivado de la enfermedad del tizón temprano y los síntomas que suelen manifestarse son; lesiones necróticas oscuras rodeadas por halos cloróticos. *A. alternata* crece en seis días, se caracteriza por desarrollar micelios ramificados septados y adquieren un color marrón claro a un marrón oscuro (Figura 4). Producen conidios de forma obclavados a obpiriformes (Kumar *et al*, 2017; Khalil *et al.*, 2021).



**Figura 4. Micrografía de conidios de *A. alternata*.** Los conidios del hongo con forma ovoide y en cadena color marrón (Fuente propia).

Otra de las enfermedades causada por *A. alternata* son las manchas foliares, el cual provoca afectaciones de forma directa al cultivo de *C. annuum L.* (Figura 5), además, su bajo rendimiento de producción genera pérdidas económicas por encima del 60% al menos en regiones asiáticas donde es ampliamente cultivado, principalmente en China (Shoabib *et al.*, 2021).



**Figura 5. Actividad patógena de *A. alternata*.** Manchas foliares en *Capsicum annuum* L. (Kazerooni *et al.*, 2021).

**2.2.3. *Fusarium oxysporum*.** Este hongo fitopatógeno se ha encontrado que es causante de la enfermedad de la marchitez vascular para algunas hortalizas de mayor cultivo como son; *C. annuum* L. y *S. lycopersicum* L. (Chowdhury *et al.*, 2020). *F. oxysporum* está compuesto por estructuras que le otorgan resistencia llamadas Clamidosporas, macro y microconidios que producen micelio y esporas (Figura 6) con los cuales, logran penetrarse en las raíces a través de las heridas de la planta provocada por insectos, nematodos o por las propias raíces secundarias al emerger en la misma planta (Dewi *et al.*, 2021).



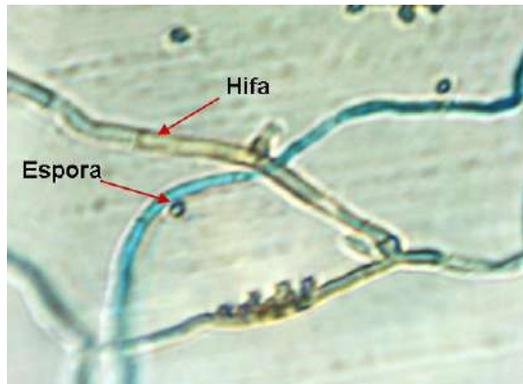
**Figura 6. Observación microscópica de *F. oxysporum*.** Macronidios largos y curvos con forma de canoa (Jiménez-Pérez *et al.*, 2022).

Además, el hongo perjudica directamente el cultivo de *C. annuum* L. (Figura 7), tan sólo en México, el rendimiento de su producción se ve reducido por el ataque de *F. oxysporum* causándole graves daños al sistema radicular de dicha planta (Sánchez-García *et al.*, 2019). También, conlleva una mayor incidencia durante la etapa de plántula generando desprendimiento de este. Los síntomas que presentan las plantas afectadas es la muerte prematura, donde se ha observado obstrucción y desequilibrio de la actividad de los haces vasculares, trayendo al mismo tiempo la defoliación, cambios de color, rizado del follaje, daño a estructuras reproductivas, pudrición de la raíz y necrosis en el tallo (Miguel-Ferrer *et al.*, 2021). Además, en términos económicos, se sabe que *F. oxysporum* genera pérdidas de producción alrededor de un 60 %.



**Figura 7. Efecto fitopatógeno del hongo *F. oxysporum*.** Marchitez vascular en *C. annuum* L. (Hernández Castillo *et al.*, 2014).

**2.2.4. *Rhizoctonia solani*.** Este hongo fitopatógeno, tiene la capacidad de producir micelio o esporas que le permiten esparcirse a través del suelo y a su vez, ocasionar daños severos durante el crecimiento de la planta huésped (Figura 8). Es considerado como uno de los hongos patógenos de amplio espectro que daña a los cultivos, entre las plantas pertenecientes a la familia Solanaceae se encuentran; *C. annuum* L. y *S. lycopersicum* L. Por otra parte, se le atribuye como agente causante importante de la enfermedad de marchitez que afecta a las plántulas de *C. annuum* L. lo cual, trae como consecuencia la reducción de su productividad (Figura 9).



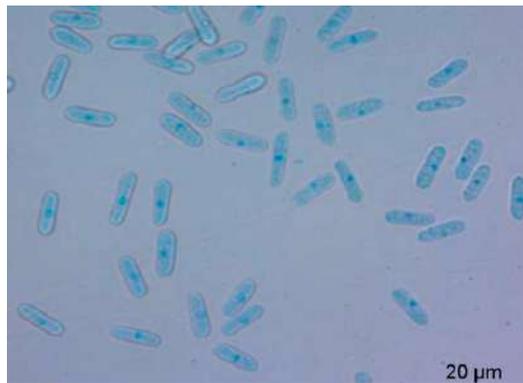
**Figura 8. Estructura morfológica de *R. solani*.** Las flechas rojas indican la espora e hifa septada (Fuente propia).

*R. solani* se caracteriza por propiciar algunos síntomas comunes tales como; damping-off, pudrición de la raíz, cancro del tallo y ataques directos al fruto. Además, durante la etapa de poscosecha, se ha encontrado que el hongo perjudica el fruto de *S. lycopersicum* L. durante su almacenamiento y transporte. Mientras que, durante su cultivo, al estar en contacto el fruto en un suelo infestado con *R. solani*, su rendimiento de cosecha se ve afectado un 20 %. Ante tal panorama, representa una problemática en el comercio del producto agrícola debido a tales infecciones descritas (Marzouk et al., 2021).



**Figura 9. Síntomas ocasionados por *R. solani*.** Marchitez y madurez prematura del chile morrón (*C. annum* L.) (Wu et al., 2019).

**2.2.5. *Colletotrichum gloeosporioides*.** La morfología del género *Colletotrichum* se caracteriza de acuerdo a su forma y tamaño de los conidios (Figura 10) los cuales, se describen como hilarios de color café que tienen extremos curvados o elipsoidales, un ápice redondo, una base estrecha y truncada. Además, forman periticios únicos o agrupados que pueden ser claviformes o cilíndricos con ascosporas cilíndricas o fusiformes (Cruz Vázquez *et al*; 2019).



**Figura 10. Micrografía de las conidias de *C. gloeosporioides*.** Esporas del hongo que presenta una forma ovoide (Rojo-Báez *et al.*, 2017).

Es un hongo patógeno que da origen a una enfermedad conocida como antracnosis, ataca a diversas hortalizas y cultivos frutales durante las etapas de poscosecha y en fases de comercialización. *C. gloeosporioides* presenta síntomas de manchas y podredumbre durante el proceso de maduración o en la fruta ya madura. Dichas manchas resultan ser pequeñas y circulares que se ven reflejados en la parte superficial del fruto (Figura 11). Consecuentemente, las manchas se van expandiendo y suelen aparecer como anillos concéntricos color negro (Srihong *et al.* 2018). Este hongo afecta el rendimiento de producción de *C. annuum* L. y *S. lycopersicum* L. por la antracnosis. En adición, *C. annuum* alcanza una producción anual nacional por arriba de 2.8 millones de t en México, sin embargo, esta hortaliza es afectado realmente por *C. gloeosporioides* causando pérdidas importantes del cultivo (De la Cruz-Quiroz *et al.* 2018; Srihong *et al.* 2018).



**Figura 11. Efecto patogénico de *Colletotrichum* spp.** Formación de manchas negras en la planta de chile poblano (Ruangwong *et al.*, 2021).

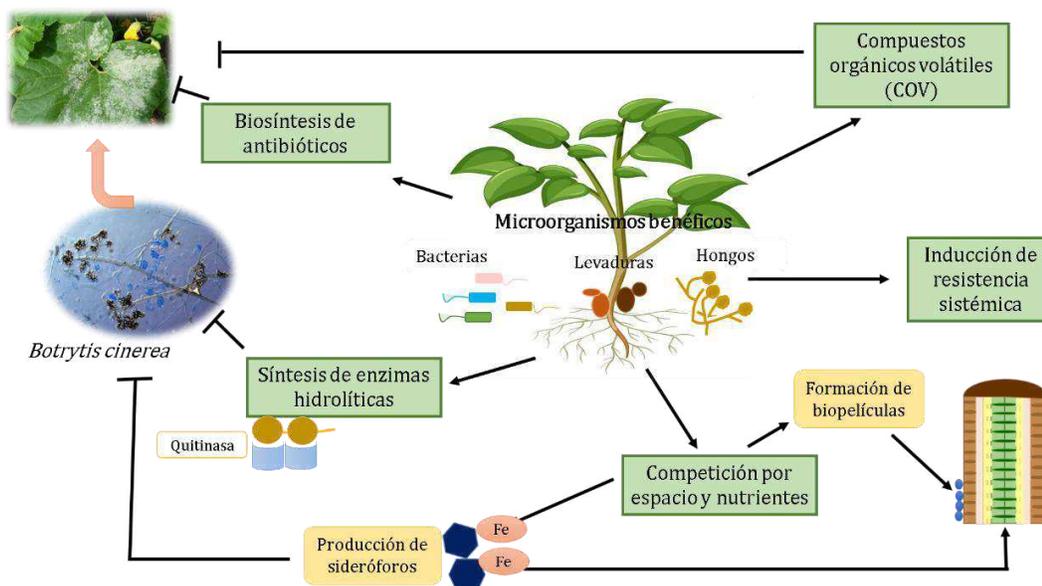
**2.2.6. *Sclerotinia* sp.** Es un hongo que tiene la capacidad de invadir a más de 400 especies de plantas, cultivos y hortalizas de importancia económica. *Sclerotinia* sp., se propaga por medio de ascosporas y puede formar estructuras denominadas esclerocios (0.5-2 mm). La infección en la planta ocurre desde la germinación de la semilla hasta que alcanza su desarrollo y madurez. Afecta principalmente tallos, hojas, flores y raíces. Su efecto patogénico depende de la cantidad de esclerocios presentes en el suelo. Además, se caracteriza por su resistencia en el suelo por años o en lotes de semillas, lugar donde se activa cuando las condiciones ambientales son favorables al desarrollar hifas infecciosas. Una de las enfermedades que genera es la podredumbre blanca que perjudica el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Zubieta-Coronado *et al.*, 2020). También, afecta el plantío del nopal (*Opuntia ficus-indica*), al menos en aguascalientes, alcanza un total de 787 000 t año<sup>-1</sup> de rendimiento en su producción (Perales-Segovia *et al.*, 2018).

### **2.3.- Métodos de control biológico contra hongos fitopatógenos**

Los hongos fitopatógenos representan una problemática para el cultivo de hortalizas de importancia económica, por lo tanto, se requiere desarrollar e implementar métodos biológicos para llevar a cabo el control y prevención de las enfermedades causadas por hongos. Entre los mecanismos de acción más estudiados, se incluyen: inducción de resistencia sistémica, síntesis de enzimas hidrolíticas,

competencia por espacio y nutrientes, biosíntesis de antibióticos y producción de metabolitos antimicrobianos como los compuestos orgánicos volátiles (COV) que pueden ocurrir en levaduras, hongos y bacterias resultando en una interacción planta-microorganismo (Figura 12). Relacionado con las enfermedades provocadas por los hongos patógenos, los agentes de biocontrol en su mayoría son cepas bacterianas y fúngicas aisladas del suelo, plantas o rizósfera. Además, se ha incrementado la comprensión de las vías por las cuales estos protegen a la planta a través de la aplicación de diversas técnicas de modificación genética y genómicas (O'Brien, 2017).

Algunos microorganismos son altamente específicos para un patógeno en particular comparado a los productos químicos sintéticos que no pueden hacer dicha diferenciación. En adición, se consideran menos nocivas para otras especies que no son blanco. Razón por la cual, en las últimas décadas se han reportado la identificación de organismos biológicos eficientes para combatir enfermedades provocadas por bacterias y hongos en los cultivos, incrementando el interés de su utilización para su producción comercial (Köhl *et al.*, 2019).



**Figura 12. Diversos mecanismos de acción que poseen los microorganismos benéficos para el biocontrol de un hongo fitopatógeno.** Distintas estrategias son implementadas por levaduras, bacterias y hongos como respuesta de defensa a *Botrytis cinerea* (Roca-Couso *et al.*, 2021).

### 2.3.1 Producción de moléculas antibióticas

La producción de algunos antibióticos por microorganismos con control biológico (hongos y bacterias, principalmente), se obtiene a bajas concentraciones para lograr el control o inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos tales como; *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, entre otros hongos. Las moléculas antimicrobianas se basan en compuestos orgánicos, de bajo peso molecular que son sintetizados principalmente por los géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas*, como principales productores de antibióticos. Entre la clase de compuestos potenciales que producen están las proteínas y los péptidos antimicrobianos (AMPPs, por sus siglas en inglés, antimicrobial peptides and protein). (Han *et al.*, 2017; Ntushelo *et al.*, 2019). También, se incluyen; la familia de iturina (A, C, D y E), bacillomicina (D, F y L) y micosubtilina. Aquellos sintetizados por enzimas complejas denominados péptidos de síntesis no-ribosomales (NRPs, por sus siglas en inglés) que pertenecen a la familia de surfactinas y son

considerados por su actividad de amplio espectro contra fitopatógenos de la planta (Athukorala *et al.*, 2009; Pedraza *et al.*, 2019). Como ejemplo, se sabe que los biosurfactantes poseen propiedades antibióticas como los lipopéptidos lo cual, le atribuye una ventaja competitiva por eliminación de otras bacterias u hongos patógenos. Por naturaleza, los lipopéptidos (iturina, fengicina y surfactina) son importantes moléculas de señalización y, por lo tanto, se caracterizan por afectar algunos procesos biológicos como; la movilidad, la inducción de mecanismos de defensa, y la formación de biopelículas sobre el interior y la parte superficial exterior de las plantas (Jiao *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2021).

### **2.3.2 Enzimas hidrolíticas**

Según Kumari y col. (2021), es muy común que las bacterias y hongos realicen la secreción de una amplia variedad de enzimas degradadoras de polisacáridos, entre los que se incluyen; proteínas, lipasas, quitinasas, glucanasas, proteasas y celulasas. Las enzimas tienen la capacidad de degradar las paredes celulares de las hifas de hongos (u oomicetos), clamidosporas, oosporas, conidios, esporangios y zoosporas que termina en lisis y en definitiva contribuyen a la protección de la planta (Jangir *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2023). Una molécula que está relacionado con la inhibición del crecimiento del hongo patógeno *B. cinerea*, es la denominada enzima hidrolítica. Esta enzima tiene la capacidad de interferir sobre la actividad metabólica del patógeno, es decir, influye en la inhibición de la germinación de conidios y propicia la lisis de los tubos germinales. Por otra parte, existen microorganismos capaces de destruir la quitina y se han utilizado para el control biológico de patógenos microbianos. Para ejemplificar, se tiene conocimiento de que el hongo *Botrytis*, su pared celular está compuesto principalmente por glucano, para lograr su degradación se requiere la participación de dos enzimas esenciales; exo- $\beta$ -1,3-glucanasa y la endo- $\beta$ -1,3-glucanasa para lograr que el carbohidrato sea hidrolizado y dar como resultado su inhibición. En adición, la hidrólisis de la quitina también resulta ser un buen mecanismo biológico, en donde entran en acción dos

posibles enzimas: exo-quitinasa o N-acetil-b-glucosaminidasa (Roca-Couso *et al.*, 2021).

### **2.3.3 Inducción de mecanismos de defensa del huésped**

Es un mecanismo que ocurre como resultado de la liberación de elicitores (proteínas, antibióticos y volátiles), se lleva a cabo la inducción de expresión de los genes de la ruta del ácido salicílico o a través de la ruta del ácido/etileno jasmónico. En relación a esto, un mecanismo de defensa diferente es el que se conoce como resistencia sistémica inducida (RSI) y se caracteriza por su resistencia de amplio espectro contra patógenos (bacterias, virus u hongos), ante el estrés abiótico que también es inducido. Asimismo, los volátiles bacterianos tales como; acetoína, 2,3-butanodiol, metanotiol, isoprano y éster butílico del ácido acético, han sido implicados en la resistencia sistémica inducida en la planta huésped como un mecanismo de defensa frente a bacterias patógenas como *Pseudomonas syringae* pv. (Lee *et al*, 2012).

### **2.3.4 Competencia por espacio y nutrientes**

Es un mecanismo de defensa de las plantas ante los patógenos, la competición ocurre sobre o más próximo a la superficie de la planta (rizosfera). Algunas especies de bacterias que pertenecen al género de *Bacillus*, tienen la habilidad de competir por la cantidad de azúcares disponibles en la superficie de la hoja o en los exudados de las raíces de la rizosfera. Es importante mencionar que la competición ya sea por nutriente y espacio, son una característica clave para la colonización de la parte superficial de las plantas. De este modo, aquellos microorganismos que no son patógenos, son capaces de limitar la disponibilidad de nutrientes y, por lo tanto, reduce el porcentaje de germinación de esporas fitopatógenas como la invasión a la planta huésped. También, la limitación de nutrientes por lo general, tiende a disminuir el crecimiento del tubo germinativo lo cual hay menos probabilidad de que

ocurra infección, necrosis y expansión de los hongos que perjudican a los cultivos de importancia agrícola (Roca-Couso *et al.*, 2021).

### **2.3.5 Compuestos orgánicos volátiles (COV)**

Los compuestos orgánicos volátiles microbianos (COV) se producen a través de diferentes rutas metabólicas que ocurren en *Bacillus*, cumplen con ciertas características específicas, entre ellas; poseen un peso molecular bajo que abarca de 100-500 Da, son de carácter lipofílico con un punto de ebullición bajo y presión de vapor alto (0.01 kPa). Dichas propiedades facilitan su evaporación y distribución a temperatura y presión normales lo cual permite abarcar diferentes distancias logrando atravesar así, la atmósfera y el suelo. La distribución y producción realizada por los microorganismos transmitidos por el suelo, dependen por ciertos factores, entre los que se comprenden; disponibilidad de nutrientes y oxígeno, temperatura, pH, estado fisiológico de los microorganismos, humedad del suelo, textura y complejidad (Caulier *et al.*, 2019). De acuerdo a la literatura, se tienen registrados 1860 compuestos orgánicos volátiles microbianos únicos en la base de datos mVOCs versión 3.0 que se sabe, son emitidos de 604 bacterias y 340 de especies de hongos diferentes (Chandrasekaran *et al.*, 2022).

Los COV se agrupan en base a su estructura química de la siguiente manera; aldehídos, cetonas, alkanos, benzenoides, pirazinas, sulfidos, alcoholes y ésteres producidos por *Bacillus* (Grahovac *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2022). Sin embargo, algunos reportes señalan otros dos géneros bacterianos como principales productores de COV, *Pseudomonas* y *Enterobacter* (Feng *et al.*, 2022). Por otro lado, a grandes rasgos se ha descrito algunos mecanismos de acción de los COV producidos por diversas cepas de *Bacillus*, especialmente relacionada a la supresión de hongos patógenicos de la planta. Al respecto, la efectividad y eficiencia de los COV es fundamental, el medio de cultivo y el tiempo son parámetros esenciales para el crecimiento y el tipo como el contenido de COV, respectivamente que influye en el rendimiento de producción. Por ejemplificar, se detectó el

compuesto benzotiazole y 2,4-ditert-butilfenol producido por *B. subtilis* CF-3 a un tiempo de 24 h que exhibieron una eficiencia antifúngica de 73.46% y 63.63% contra *Monilinia frutícola* y *C. gloeosporioides*, de forma respectiva (Gao *et al.*, 2018). Otra función que tienen los COV, son las alteraciones que puede causar sobre la permeabilidad de la membrana cuyos efectos pueden resultar variados; morfología de la colonia distorsionada, células deformes y desintegración, formación de inclusiones, movimiento del contenido citoplásmico con la inevitable ruptura de la membrana del citoplasma, entre otros (Grahovac *et al.*, 2023). Por último, dentro de los mecanismos de acción más importantes de los COV, es su capacidad de alterar la expresión de genes que están relacionados a la patogenicidad, metabolismos y actividad antioxidante de los hongos fúngicos. Un ejemplo de ello, es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno que llegan a causar la muerte celular micelial e inhibir la actividad de enzimas patogénicas como la pectinasa y celulasa (Zhao *et al.*, 2019; Xie *et al.*, 2020). Bajo este mismo contexto, merecen destacarse el benzotiazol, el benzaldehído, el fenilacetaldehido, el ciclohexanol, 2-etil-1-hexanol, el 2,3-butanodiol, el n-decanal y el nonanal entre otros compuestos, de los que se ha comprobado su actividad antimicrobiana (Pedraza *et al.*, 2019). Finalmente, los COV producidos por *Bacillus*, no liberan residuos tóxicos sobre las superficies de las plantas y su biodegradabilidad es evidente lo cual manifiesta ser beneficioso y amigable al ambiente (Grahovac *et al.*, 2023).

#### **2.4.- Importancia sobre la caracterización de bacterias aisladas en semillas**

Hay evidencia de que la mayoría de los miembros del microbiota presente en semillas, han demostrado ciertos beneficios importantes para el crecimiento y la salud de las plantas, entre los que se incluyen; adquisición de nutrientes, promoción del crecimiento de la planta y mecanismos de acción de defensa. Relacionado a esto, los endófitos bacterianos contribuyen a la adquisición de nutrientes para las plantas por medio de la fijación del nitrógeno biológico, solubilización y producción de sideróforos. Además, algunas bacterias (tales como *B. amyloliquefaciens*, *B.*

*safensis* y *B. siamensis*, entre otros) han demostrado habilidad para llevar a cabo la estimulación en el desarrollo y crecimiento de la planta de forma directa, el cual consiste en la producción microbiana de fitohormonas tales como auxinas (IAA, ácido indol acético) siendo un estimulador de crecimiento mejor conocido que favorece a las raíces. Y de la ruta indirecta, abarca la reducción de los niveles de la hormona de estrés de la planta (etileno) que se encarga de suprimir el crecimiento de la planta para la conservación de los nutrientes (Khalaf y Raizada, 2016; Wu *et al.*, 2018; Altamira *et al.*, 2022). Otro beneficio de gran importancia de los endófitos bacterianos es la protección que le otorga a la planta ante plagas y enfermedades (Samreen *et al.*, 2021).

En tal sentido, reportes recientes han exhibido que los agentes de control biológico bacterianos contra hongos fitopatógenos, en su mayoría suelen pertenecer al género de *Pseudomonas* y *Bacillus* (Dowarah *et al.*, 2021). Cabe resaltar que las bacterias han demostrado tener actividad antagonista ante diversos agentes patógenos que tienden a ocasionar enfermedades a las plantas y, además, se ha comprobado su potencial para producir compuestos bioactivos con funciones antimicrobianas (Khalaf *et al.*, 2018).

Por otra parte, investigaciones actuales han dirigido su atención sobre las interacciones existentes entre la planta y bacterias endófitas, ya que representa una alternativa para fomentar la agricultura de manera sustentable y al mismo tiempo, mejorar la productividad de los cultivos y asegurar la calidad de los productos agrícolas de importancia económica. Partiendo de la detección y aislamiento de bacterias en semillas de plantas, un estudio llevado a cabo por Pal *et al.* (2022), demostraron que las cepas bacterianas aisladas de semillas del maíz (*Zea mays* L.) poseen rasgos que participan en el crecimiento de plántulas de dos diferentes variedades del mismo, entre los que se incluyen; síntesis de auxinas, solubilización de fosfatos y habilidad para la fijación del nitrógeno. Dentro de este orden de ideas, existe la evidencia sobre el aislamiento de *Bacillus* en semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.), de acuerdo a una investigación realizado por Mukherjee y col. en

2020, identificaron bacterias endófitas a partir de semillas germinadas y secas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) así como el estudio acerca de sus propiedades funcionales. En efecto, aislaron 29 cepas bacterianas de las semillas de garbanzo y comprobaron que las bacterias endófitas pertenecían a *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus* sp., *Pantoea* sp. y *Mixta* sp. Se debe agregar que este cultivo (modelo principal de estudio), es considerado como uno de las legumbres de gran importancia a nivel mundial por ser un alimento nutritivo, siendo crucial su producción para asegurar la seguridad alimentaria y el mejoramiento de la fertilidad del suelo (Mukherjee *et al.* 2020).

## **2.5. Importancia del género de *Bacillus***

Las bacterias que forman parte del género *Bacillus*, tienen la particular característica de producir esporas y por tal razón, han sido ampliamente estudiadas como una opción viable desde el punto vista agro-biotecnológico en el control de fitopatógenos (Valenzuela Ruiz *et al.*, 2020). Estos microorganismos son de gran interés porque algunas de sus cepas pueden emplearse como alternativa de control biológico. En efecto, logran una rápida colonización y replicación, son ubicuas ya que se encuentran distribuidas en diversos ambientes tales como; agua, suelo, alimentos, plantas y son capaces de sobrevivir en condiciones muy hostiles (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

Adicionalmente, algunas especies de *Bacillus* han sido declaradas como organismos seguros para la salud o el ambiente (GRAS) (Generally Recognized as Safe, por sus siglas en inglés) y esto, favorece su comercialización y utilización dentro del sector agrícola para el manejo de plagas y enfermedades (Pedraza *et al.*, 2019). Los diversos mecanismos de acción ya sea de forma directa o indirecta, tales como la mejora del crecimiento de la planta, desarrollo y tolerancia frente al estrés biótico y abiótico que poseen los miembros del género *Bacillus* sp., se incluyen también; síntesis de enzimas líticas, colonización y formación de biopelícula,

inducción de resistencia vegetal y la producción de compuestos antimicrobianos (Valenzuela Ruiz *et al.*, 2020).

Un ejemplo *B. subtilis* es una bacteria ubicua gram positiva que ha reflejado tener una inusual adaptabilidad genética y esto le ha permitido poseer una gran habilidad para colonizar diversos hábitats naturales. Siendo un organismo no patogénico, exhibe una diversidad genética y, por lo tanto, se caracteriza por ser un organismo modelo dentro del laboratorio gracias a su habilidad de dar formación a una biopelícula y de favorecer la esporulación. *B. subtilis* es muy utilizado dentro de la industria biotecnológica, en la síntesis de un gran alcance de productos que abarcan desde enzimas a productos químicos; formulación de biopesticidas, bacteriocinas, lipopéptidos, sideróforos, policétidos, compuestos orgánicos volátiles, lipasas, proteasas y  $\beta$  glucanasas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011; Mirkasimovna *et al.*, 2017). Cabe mencionar que estas bacterias son fáciles de manipular a nivel genético por su competencia natural, carecen de membrana externa y cuentan con sistemas de expresión que han sido descritos a detalle lo cual las convierten en principales microorganismos de elección (Kaspar *et al.*, 2019). *B. subtilis* tiende a ser una especie muy compleja, debido a que forma parte de cuatro especies homogéneas filogenéticamente y fenotípicamente, tales como; *B. subtilis*, *B. amyloquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*. En general, producen ciertos metabolitos secundarios como bacitracina, bacilisina, rizoctina, petrobactina y bacilibactina que en conjunto forman parte de los péptidos no ribosómicos (sintetizados por las sintetasas peptídicas no ribosómicas) con propiedades antibacterianas y antifúngicas (Kiesewalter *et al.* 2021). Cabe resaltar que el 4 y 5% del genoma de *B. subtilis*, está dedicado a la producción de metabolitos secundarios (Lipopéptidos o péptidos y compuestos orgánicos volátiles, principalmente) (Fira *et al.*, 2018).

### 2.5.1.- *Bacillus* asociados a semillas de algunas hortalizas

Los endófitos son simbioses que se encuentran al interior de los tejidos de las plantas incluyendo las semillas. Los endófitos de las semillas pueden ser encontrados en el microbioma de las plantas jóvenes que han mostrado tener habilidad para la promoción de la defensa del huésped durante la germinación de la semilla y en sus últimas etapas de desarrollo. Pueden transmitirse a las siguientes generaciones de forma vertical por medio de las semillas. Se ha encontrado que la relación existente entre los microorganismos y las semillas, tienden a cumplir una función importante en el ciclo de vida de la planta. Participan en la salud de la planta y favorecen su germinación, además, promueve la proliferación de las comunidades bacterianas para el desarrollo de una planta nueva donde ellos son capaces de aportar beneficios a sus huéspedes y a su vez, las propias plantas hacen uso de las semillas como principales vectores microbianos (Khalaf & Raizada, 2016).

En específico, las bacterias que forman parte del género de *Bacillus* se caracterizan por ser ubicuas y de fácil manipulación, tienden a crecer en diferentes entornos ambientales. Se sabe que se ha detectado su presencia en semillas de diferentes productos agrícolas; jitomate, maíz y chile (por mencionar algunos ejemplos). En ese mismo contexto, de acuerdo a Yang y col. (2020) mencionan que las semillas albergan una amplia variedad de microorganismos que facilitan su transmisión por generaciones y al mismo tiempo, genera un impacto significativo sobre la ecología de la planta. Del mismo modo, pueden ser utilizados para incrementar la producción y calidad de los cultivos agrícolas, así como su aplicación en el control biológico de algunos de agentes fitopatógenos.

Por otra parte, existen algunas evidencias sobre el aislamiento de bacterias pertenecientes a algunos géneros; *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Sphingomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., etc., todos ellos encontrados en semillas de la hortaliza de maíz (*Z. mays* L.). Con el interés de conocer si *Bacillus* es capaz de promover la germinación de las semillas,

crecimiento y desarrollo de las plántulas de *Z. mays* L., entre otros atributos que favorezcan la salud de la planta, fue efectuado la investigación y lograron aislar un total de 23 cepas bacterianas (identificados mediante la secuenciación del ARNr 16S) a partir de semillas de dos variedades distintas de la hortaliza. La mayoría de las cepas encontradas, cumplieron con algunos rasgos de crecimiento de la planta; síntesis de auxina (un 70 %) y solubilización de fosfato (74 %), y todos demostraron fijación de nitrógeno. Sólo uno de ellos, *B. valeziensis* ZMW8, presentó actividad antagónica frente a *R. solani* y *F. verticilliodes*. (Yang *et al.*, 2020; Pal *et al.*, 2022). También, hay hallazgos sobre la detección y aislamiento de bacterias en semillas de jitomate (*S. lycopersicum* L.), según un trabajo de investigación, se obtuvieron un total de 75 aislados bacterianos de dos variedades orgánicas de la hortaliza. Sólo una bacteria identificada como *B. siamensis* NKIT9, exhibió actividad antifúngica contra cinco hongos patógenos; *B. cinerea*, *R. solani*, *F. solani*, *Verticillium lateritium* y *A. solani* con un porcentaje de inhibición micelial que abarcó un 70 y 90%, además, la inhibición fue a causa de la producción de lipopéptidos (surfactina y bacilomicina D). La cepa bacteriana no sólo logró inhibir el crecimiento de los hongos, sino que mejoró el rendimiento del fruto un 59.2% (Sharma *et al.*, 2021).

## **2.7.- Especies del género *Bacillus* asociados a semillas de *Capsicum***

La investigación sobre la identificación y caracterización de *Bacillus* en semillas de *Capsicum*, es muy limitado, la mayoría han sido estudiados principalmente en otras partes de la planta. Tal es el caso de bacterias que fueron aisladas en hojas, tallos y raíces de la planta de *C. annuum* L. en donde se obtuvieron aproximadamente 48 cepas bacterianas. La mayoría de ellas correspondían a *Bacillus*, asimismo, presentaron potencial inhibitorio sobre el crecimiento de dos hongos patógenos; *F. oxysporum* y *Colletotrichum* sp. Los aislados ESK-26 y ESK-2 fueron hábiles en suprimir el desarrollo de ambos hongos con un 63.85% y 61.25% contra *F. oxysporum* y *Colletotrichum* sp. de forma respectiva. Añadir que ambas cepas, influyeron sobre varios atributos de crecimiento de la planta, tales como; el peso de

la planta, número de hojas y el total del peso seco de las plantas de chile (Kammar *et al.*, 2021).

El aislamiento de bacterias a partir de semillas de *Capsicum*, que tengan actividades antifúngicas y con la particularidad de producir compuestos bioactivos para el biocontrol de hongos fitopatógenos, es realmente escaso. Sin embargo, hay algunas evidencias sobre el aislamiento de bacterias en semillas de *Capsicum*. Para ejemplificar, se encontró una bacteria benéfica del género de *Kosakonia* denominada *Kosakonia cowanii* Cp1 en semilla de chile manzano (*Capsicum pubescens*) el cual, demostró inhibición micelial de diferentes hongos fitopatógenos estudiados por acción de los compuestos orgánicos volátiles producidos por la bacteria en cuestión. Los porcentajes de inhibición que se determinaron, fueron un 87.45% y 77.24% hacia *Sclerotinia* sp. y *R. solani*, respectivamente (Hernández Flores *et al.*, 2023). Otro hallazgo, a partir de la semilla de *Capsicum chinense*, fueron aislados 32 endófitos bacterianos, entre los detectados incluyen; *B. subtilis* (KJ-2), *B. velezensis* (KJ-4), *Leuconostoc mesenteroides* (KP-1), *Lactococcus lactis* (LB-3), *B. amyloliquefaciens* (WK-2) y *B. subtilis* (WK-3) de los cuales, únicamente la cepa de *B. subtilis* (KJ-2) reflejó una eficacia de biocontrol alto (86.6%) sobre la marchitez bacteriana ocasionado por *R. solanacearum* en la planta de jitomate (*S. lycopersicum* L.). Por instancia, la actividad antimicrobiana se debió a la producción de varios compuestos orgánicos volátiles por *B. subtilis* (KJ-2); pirrolo [1, 2a]pirazina-1, 4-diona hexahidro-3-(2metilpropilo), Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(fenilmetilo) Pirrol[1,2-a]pirazina-1,4 diona, hexahidro; 2,5-Piperazindiona, 3,6- bis(2-metilpropil)- y ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster de diisobutilo (Dowara *et al.*, 2021). De acuerdo a lo descrito anteriormente, es importante comprender la participación de los COV producidos por algunas especies bacterianas en el biocontrol de hongos de importancia agroeconómica.

## **2.8. Compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por bacterias del género *Bacillus***

De acuerdo a Toral *et al.* (2018), señala que algunos microorganismos poseen la habilidad de actuar como agentes de control biológico mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles, sin embargo, la mayoría de las investigaciones han puesto su atención en los miembros que pertenecen al género de *Bacillus*. Estas bacterias se caracterizan por su capacidad de producir COV de amplio espectro que han revelado algunas funciones esenciales para el desarrollo y defensa de la planta, tal es el caso de la especie de *B. amyloliquefaciens* cuyo organismo sintetizó algunos compuestos volátiles (2-nonanona, 2-heptanona, acetoina y 2,3-butanodiol) con propiedades antifúngicas y promueve el crecimiento de la planta (Wu *et al.*, 2019). Otra de las bacterias más estudiadas y evaluadas es *B. velezensis* el cual, produce el COV ftalato de dibutilo con bioactividad de control del hongo *B. cinerea* y promueve el crecimiento de la planta (Feng *et al.*, 2022). Por otra parte, las bacterias endófitas que se transmiten a través de las semillas han llamado la atención por ser capaces de sintetizar compuestos antifúngicos y presentan rasgos que promueven el mejoramiento de la planta. Un claro ejemplo de ello, *B. subtilis* y *B. megaterium*, lograron disminuir las pudriciones originadas por *R. solani* en los frutos de jitomate (*S. lycopersicum* L.) y por sí fuera poco, tuvieron un efecto notorio en la longitud del hipocótilo, radícula, el peso fresco y sobre el desarrollo de las plántulas de la planta. Los COV producidos por *Bacillus* y que influyeron en la defensa y mejoramiento de la planta fueron los siguientes; 2-heptanona, pirazina, 2,5-dimetil, naptalina y bencenamina, N-etil- (Marzouk *et al.*, 2021).

Los agentes de control biológico, son fundamentales para la inhibición de los hongos fitopatógenos que tanto daño ocasionan a las hortalizas de importancia económica. Se sabe que hay diversos mecanismos de acción para asegurar la sanidad, protección y promoción del crecimiento de las plantas. En general, la rizósfera y el microbioma de la raíz endófito, tienen funciones clave en el crecimiento y salud de la planta, además de otorgarle protección contra las infecciones provocadas por

patógenos. En particular, la colonización de la raíz representa una forma efectiva para la formación de una biopelícula en las raíces lo cual es esencial para otorgarles protección frente a hongos fitopatógenos. En relación a esto, se han identificado genes vinculados a la colonización por medio del análisis de todos los datos de secuenciación del genoma de la cepa de *B. velezensis* YW17. Encontraron que los genes correspondientes a *efp*, *hfq*, *epsA-O* y *spo0a*, están implicados en la formación de comunidades bacterianas que crecen embebidas en una matriz de exopolisacáridos adheridos a un tejido vivo; el gen *sinI* lo identificaron como un gen positivo regulador del mismo, el cual suprime la síntesis de surfactina; *lysC* y *yjbB*, participan en la colonización de la raíz; *flgK* y *fliD* están relacionados con los ganchos flagelares; y *srfABC* puede favorecer la colonización de raíces y ayudar en la adquisición de nutrientes. Cabe agregar que se describió el mecanismo de supresión de *B. velezensis* YW17 contra *F. oxysporum* en el cual, identificaron 18 genes relacionados a la síntesis de metabolitos secundarios y la mayoría codificados por los genes que desempeñan funciones antifúngicas. Además, encontraron COV producidas durante el crecimiento de *B. velezensis* YW17 que exhibió un efecto antagonista contra *F. oxysporum*. Dichos experimentos fueron confirmados por la anotación del genoma cuyos genes envueltos en la ruta biosintética de acetoína fueron; *livB* y *alsD*. La acetoína emitido por *B. velezensis* YW17, puede convertirse espontáneamente a diacetil bajo condiciones aérobicas (Wei *et al.*, 2023).

### **3. HIPÓTESIS**

Los aislados bacterianos de *Bacillus* spp. presentes en semillas de *Capsicum annuum*, tienen capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles (COV) con actividad antagonista para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos; *Sclerotinia* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Evaluar la capacidad antifúngica de *Bacillus* spp. aislados de semillas de *Capsicum* spp. contra los hongos fitopatógenos mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV).

### 4.2 Específicos

- Aislar y evaluar cepas de *Bacillus* spp. de semillas de *Capsicum* contra *Sclerotinia* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*.
- Determinar el análisis del genoma de *Bacillus* spp. que presente mayor actividad antagonista y describir los genes envueltos en la virulencia, resistencia a antibióticos, así como en la síntesis de COV.
- Obtener y caracterizar el perfil de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus* spp. con capacidad de inhibir el crecimiento micelial de los hongos.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Obtención de cepas de hongos fitopatógenos**

Para determinar la actividad antagonista de *Bacillus* spp., se utilizaron los siguientes hongos fitopatógenos; *Sclerotinia* sp., *R. solani*, *S. rolfsii*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*. Las cepas fúngicas fueron proporcionadas por el Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar quién dirige el Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### **5.2 Aislamiento de bacterias a partir de semillas de *Capsicum* spp.**

Para la obtención de cepas de *Bacillus* spp., se realizó la colecta de frutos frescos y maduros de diversas variedades de chile en el estado de Querétaro, Yucatán y Michoacán. Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio para la extracción de las semillas. Primero, se desinfectaron los frutos de chile a través de la inmersión dentro de una disolución de agua destilada y cloro (10% v/v) durante 15 min. Después, se realizó una desinfección con etanol (95% v/v) en toda la parte superficial del chile durante 10 min (Hernández Flores *et al.*, 2023). Se dejaron secar dentro de la campana de bioseguridad, después, con una navaja y pinzas estériles, las semillas del fruto fueron extraídas y fueron colocadas en medio nutritivo de cultivo agar triptona de soya (ATS) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) para el crecimiento de las bacterias con la siguiente composición; agar (15 g/L), trípticaseína de soya (30 g/L). Preparado el medio nutritivo, fueron colocados de forma aleatoria y distribuida cada una de las semillas y se incubaron a 30 °C durante 1 a 2 días. Finalmente, fue hecha la selección de colonias desarrolladas en el medio nutritivo, el cual se basó en cuanto a su morfología (tamaño, color y forma) hasta obtener un cultivo puro mediante la técnica de siembra por agotamiento en estría.

### **5.3. Evaluación antifúngica *in vitro* de las bacterias aisladas en consorcio bacteriano**

Una vez que se obtuvieron los aislados bacterianos de las semillas de *Capsicum* spp., como ensayo preliminar, se realizó la evaluación antagónica mediante la técnica de doble placa y doble cultivo (Gao *et al.*, 2018). Para armar el dispositivo de placas de plástico de doble compartimento, primero, se preparó la placa inferior con el medio agar triptona de soya (ATS) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), se dividió en diversas partes iguales y en cada segmento se inoculó con una colonia bacteriana diferente mediante la técnica de siembra en estría. Por otra parte, en la caja superior, se utilizó el medio agar papa dextrosa (APD) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) inoculada con un disco micelial de 8mm de diámetro del hongo patógeno de prueba *S. rolfsii* colocado en el centro. Después, ambas placas fueron selladas con cinta para caja Petri, se incubó a 28°C durante 3-4 días. Finalmente, fueron seleccionados aquellos aislados bacterianos que demostraron actividad inhibitoria micelial contra *S. rolfsii*.

### **5.4. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de los aislados bacterianos seleccionados**

Para determinar la actividad antifúngica de dos aislados bacterianos elegidos, se implementó el ensayo de doble placa y doble cultivo (descrito en la sección 5.3) contra seis hongos fitopatógenos. Previamente, se resuspendieron las bacterias aisladas CH05 y CH13 en 1 ml de peptona (0.1%) estéril contenido en un tubo eppendorf (1.5 ml). En seguida, la caja inferior con el medio agar triptona de soya (ATS) fue inoculada con 100 µl de la suspensión bacteriana preparada mediante el método de siembra por extensión superficial (Hernández Flores *et al.*, 2023). Después, en la segunda caja superior, se sembraron en medio agar papa dextrosa (APD) un disco de 8 mm de *Sclerotinia* sp., *R. solani*, *A. alternata*, *S. rolfsii*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*. Posteriormente, las placas fueron selladas con cinta para caja Petri y las placas fueron incubadas a 28 °C durante 3 a 9 días

(dependiendo de cada hongo). Para el tratamiento control, sólo se dejó el hongo en ausencia de la suspensión bacteriana. Al mismo tiempo, fueron medidas las zonas de inhibición diariamente hasta que el crecimiento de los hongos alcanzará el borde de las placas testigo. Al final, el porcentaje de inhibición micelial fue calculado usando la siguiente fórmula (Ruangwong *et al.*, 2021):

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{R1 - R2}{R1} * 100 \quad (1)$$

Donde;

R1 = es el crecimiento radial del hongo fitopatógeno como control

R2 = es el crecimiento radial del hongo fitopatógeno con tratamiento

### **5.5. Extracción de ADN y secuenciación completa del genoma de las bacterias seleccionadas**

La purificación de ADN genómico de las cepas bacterianas, se realizó con kit de extracción ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA) siguiendo las instrucciones del protocolo. El ADN se procesó y analizó con Shotgun Metagenomic Sequencing Service (Zymo Research, Irvine CA) el cual se describe brevemente a continuación; se prepararon las bibliotecas de secuenciación con Illumina® DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA) y la biblioteca obtenida fue secuenciada en la plataforma NovaSeq® (Illumina, San Diego, CA). Los análisis bioinformáticos se ejecutaron con la plataforma bioinformática bacteriana y viral (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center, BV-BRC) y fueron enviados al servicio de análisis integral del genoma en PATRIC (Olson *et al.*, 2023). Después, el genoma fue anotado con la ayuda de las herramientas RAST (RASTtk) (Brettin y col. 2015) y el mapa circular del genoma se dibujó mediante el uso de CIRCOS (Krzywinski *et al.*, 2012). De acuerdo a la referencia más cercana y genomas representativos, se identificaron por la aplicación de Mash/MinHash (Ondov *et al.*,

2016). Las familias de proteínas globales PATRIC (PGFams) (Davis *et al.*, 2019) fueron seleccionadas de estos genomas para determinar el análisis filogenético. Las secuencias de la proteína de estas familias alineadas con MUSCLE (Edgar, R.C. 2004) y los nucleótidos para cada una de aquellas secuencias, se mapearon a la proteína de alineamiento. El conjunto de alineaciones de aminoácidos y nucleótidos se concatenaron en una matriz de datos, y RAxML (Stamatakis, A. 2014) fue utilizado para analizar dicha matriz, además, con fast bootstrapping (Stamatakis, *et al.* 2008) se aplicó para la generación de los valores de soporte en la construcción del árbol filogenético.

## **5.6. Prueba de sensibilidad a antibióticos**

La prueba de sensibilidad a antibióticos, se llevó a cabo mediante la técnica de difusión disco en base a la guía de CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines) para *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13. Cada una de las cepas, se diluyeron en una solución de 1 ml de peptona (1%). A continuación, de la suspensión bacteriana fue tomado 100 µl y se transfirió a la superficie de dos cajas con el medio Agar Mueller-Hinton hasta secar. Finalmente, se probaron los siguientes antimicrobianos: clindamicina (30 µg), dicloxacilina (1 µg), eritromicina (15 µg), penicilina (10 U), tetraciclina (30 µg), vancomicina (30 µg), amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), carbenicilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacino (10 µg) y sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg). Las placas de cultivo fueron incubadas a 37° de 18-24 h y se tomó el registro de las mediciones de las zonas claras que presentaron inhibición (mm).

## **5.7. Extracción de los compuestos orgánicos volátiles (COV)**

La extracción de los filtrados bacterianos libres de células, se ejecutó siguiendo el siguiente procedimiento (Hérendez Flores *et al.*, 2023); fue preparado con Caldo Soya Tripticaseína (TS) con un volumen total de 320 ml y se distribuyó en 8 frascos

para laboratorio graduado con tapa azul de polipropileno azul (40 ml cada uno). Después de su esterilización, se inocularon los frascos con *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13 y fue incubado durante 48 h a 37 °C en agitación constante. Como siguiente paso, se muestrearon cada 12 h para obtener los filtrados libres de células; primero fue tomado 1 ml del cultivo bacteriano con una micropipeta y se transfirió a 4 tubos eppendorf estériles (1.5 ml). A continuación, se hizo la centrifugación a 14,000 rpm durante 5 min (dos veces) y se recuperó el sobrenadante con la ayuda de una jeringa estéril y se filtró a tres tubos eppendorf estériles. Luego, en el centro de la caja Petri con medio Agar Papa Dextrosa (APD) fue inoculado con 500 µl de cada uno de los filtrados obtenidos y posteriormente se colocó un disco micelial (8 mm) de *S. rolfisii* y *A. alternata* por separado. Finalmente, las cajas fueron selladas e incubadas a temperatura ambiente en la oscuridad, se midieron los diámetros de los hongos fitopatógenos diariamente hasta que la cepa control (sin el filtrado bacteriano) alcanzará el borde de la caja.

Los filtrados obtenidos en un lapso de 24 h en ambas cepas, demostraron mayor actividad inhibitoria micelial y fueron utilizados para analizar la composición de los COV mediante la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplado con cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).

#### **5.8. Análisis de COV mediante la técnica de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza acoplado con cromatografía de gases y espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS)**

Como primer paso, se inocularon ambas cepas bacterianas, *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13 en frascos de medio de vidrio de borosilicato de 80 ml (Schott) con Caldo Soya Trypticaseína a 37 °C durante 24 h (tiempo que mostró mayor efecto inhibitorio micelial) bajo condiciones de agitación constante (100 rpm). Las muestras obtenidas de cada cultivo bacteriano, fueron procesadas de acuerdo a la siguiente metodología expuesta; fueron incubados a 50 °C durante una hora. Los COV se

colectaron sobre una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, Supelco, Signa-Aldrich, Visalia, CA, USA). Enseguida, la inyección manual se ejecutó en modo splitless (sin división) y la temperatura del puerto de inyección junto con la línea de transferencia, fue ajustada a 250 °C utilizando un GC 7820A con un MSD 5975C (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) y capilares de columna para GC HP-5MS con mediciones de 30 m, 0.25 mm y 0.25 µm (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). El horno de columna fue programado a 40°C que incrementó a 180°C a 5°C/min, después, 20°C/min a 260°C y bajo esas condiciones, se conservó a esa temperatura por 5 min. El gas acarreador designado, fue el gas helio con 99.999% de pureza (1.0 ml/min, flujo constante). Los análisis de espectrometría de masas, se trabajó con un impacto de 70 Ev cuyo rango fue de 33 a 500 m/z. Los datos se obtuvieron y procesaron a través del software de análisis instrumental NIST/EPA/NIH (biblioteca de espectrometría de masas), versión 2017, Antioch, CA, EE. UU (González Espinosa *et al.*, 2023).

### **5.9. Análisis estadísticos**

Los experimentos se realizaron por triplicado, para el tratamiento que consistió en la evaluación de *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13 contra *Sclerotinia* sp., *R. solani*, *S. rolfsii*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*. y el control, únicamente se crecieron los hongos sin la aplicación de las dos cepas estudiadas. Los datos se representaron como media con desviación estándar ( $\pm$ ) y analizado por una sola vía ANOVA a un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el uso del programa de software Minitab versión 18.0.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Aislamiento de bacterias de semillas de *Capsicum* spp.

Un total de setenta y seis colonias de bacterias, fueron obtenidos a partir de semillas de *Capsicum* spp., de tres especies diferentes; sesenta y uno aislamientos de *Capsicum annuum* L., seis de *Capsicum pubescens* y nueve de *Capsicum chinense* (Tabla 1), fueron seleccionados de acuerdo a sus fenotipos que presentaron las colonias sobre el medio de cultivo utilizado. Además, se describe el origen y cantidad de bacterias aisladas obtenidos para cada una de las variedades de chile muestreadas.

**Tabla 1.** Aislados bacterianos obtenidos de semillas de *Capsicum* spp.

Variedad de chile	Género	Origen	n° de aislados bacterianos
Poblano	<i>Capsicum annuum</i> L.	Michoacán	5
Jalapeño	<i>Capsicum annuum</i> L.	Michoacán	7
Píquin	<i>Capsicum annuum</i> L.	Michoacán	3
Serrano	<i>Capsicum annuum</i> L.	Michoacán	6
Húngaro	<i>Capsicum annuum</i> L.	Michoacán	9
Chilaca	<i>Capsicum annuum</i> L.	Michoacán	8
Habanero	<i>Capsicum chinense</i>	Michoacán	3
Manzano	<i>Capsicum pubescens</i> <i>R &amp; P</i>	Michoacán	8
Serrano	<i>Capsicum annuum</i> L.	Querétaro	5
Jalapeño	<i>Capsicum annuum</i> L.	Querétaro	2
Pimiento	<i>Capsicum annuum</i> L.	Querétaro	2
Poblano	<i>Capsicum annuum</i> L.	Querétaro	3
Serrano (semillas comerciales)	<i>Capsicum annuum</i> L.	Querétaro	4
Habanero	<i>Capsicum chinense</i>	Querétaro	5
Güero	<i>Capsicum annuum</i> L.	Yucatán	1
Dulce	<i>Capsicum annuum</i> L.	Yucatán	3
Habanero	<i>Capsicum chinense</i>	Yucatán	2

## 6.2. Actividad antifúngica de los aislados bacterianos en consorcio

Se llevó a cabo una evaluación preliminar de la actividad antifúngica de setenta y seis aislamientos bacterianos contra un hongo fitopatógeno, *S. rolfsii* el cual, se eligió por su fácil manipulación y de rápido crecimiento mediante un ensayo de doble placa. Esta técnica se implementó como una estrategia de bioprospección con el fin de seleccionar aquellas colonias bacterianas endófitas potenciales para inhibir el crecimiento de *S. rolfsii*. Un total de 17 bacterias aisladas, mostraron actividad antagonista significativo *in vitro* en consorcio contra el hongo patógeno (Tabla 2). Tal como se indica en la tabla 2, los aislamientos que exhibieron un efecto inhibitorio micelial alto contra *S. rolfsii* fueron: CH07 y CH08 (66.25%); CH11, CH12 y CH17 con 56.25%; CH03 y CH04 (56.25%) y CH09 y CH10 (51.25%). Mientras que tres consorcios presentaron un porcentaje de inhibición micelial medio, el primero de ellos: CH07, CH08, CH13 y CH14 (36.25%); el segundo, representado por CH05, CH06, CH09 y CH10 (32.5%); el tercero, CH14, CH15, CH16 y CH17 (30%) y cuarto, CH13 y CH14 que también presentó un 30% de inhibición micelial.

En base a estos resultados obtenidos, hizo posible la selección de aquellas bacterias aisladas que exhibieron mayor actividad antagónica contra *S. rolfsii* y la continuación de estudios posteriores.

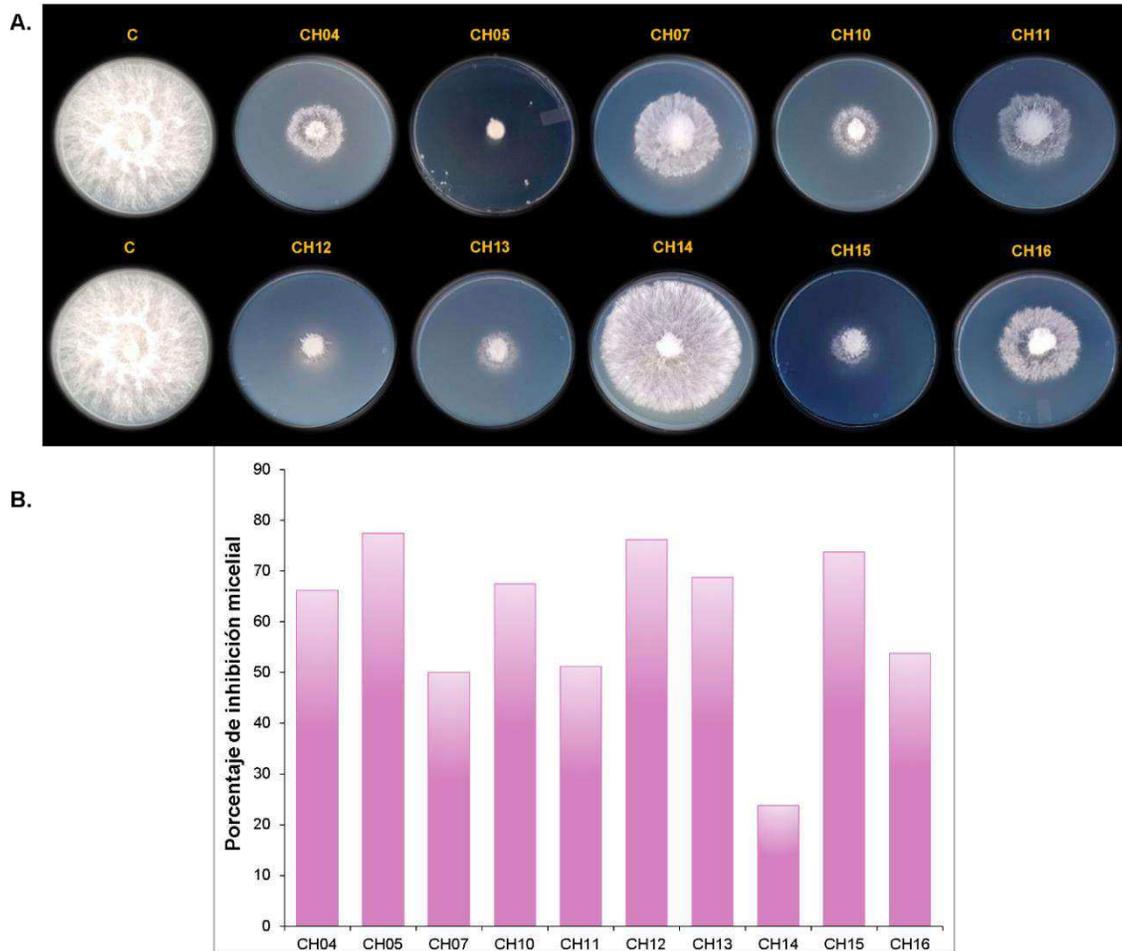
**Tabla 2.** Actividad antagonista de los aislamientos bacterianos en consorcio hacia *S. rolfsii*.

<b>Consorcio bacteriano</b>	<b>Inhibición micelial (%)</b>
CH15, CH16	12.5
CH01, CH02	16.25
CH05, CH06	20
CH11, CH12	20
CH05, CH11, CH12, CH13	27.5
CH07, CH08, CH09, CH10, CH11, CH12	27.5
CH13, CH14	30
CH14, CH15, CH16, CH17	30
CH05, CH06, CH09, CH10	32.5
CH07, CH08, CH13, CH14	36.25
CH09, CH10	51.25
CH11, CH12, CH17	56.25
CH03, CH04	56.25
CH07, CH08	66.25

### **6.3. Evaluación de los aislados antagonistas seleccionados contra hongos fitopatógenos**

Un total de diez aislamientos, fueron evaluados individualmente para confirmar su efecto antagónico hacia *S. rolfsii* (Figura 13). En la figura 13A, se puede observar la inhibición del crecimiento micelial del hongo de forma morfológica y en la parte inferior se representan los porcentajes de inhibición micelial de crecimiento del hongo que exhibieron cada uno de las colonias probadas (Figura 13B). Como se puede apreciar en la figura 11, las bacterias aisladas mostraron un porcentaje alto de inhibición micelial contra *S. rolfsii* que corresponden a estos datos: CH05, CH12, CH15, CH13, CH10 y CH04 con 77.50%, 76.25%, 73.75%, 68.75%, 67.50% y 66.25%, en el orden dado. Sólo tres aislamientos bacterianos; CH16, CH11 y CH07 mostraron un porcentaje de inhibición medio; 53.75%, 51.25% y 50.00%, respectivamente. Y la colonia CH14, tuvo un valor de inhibición radial más bajo (23.75%). Con estos datos obtenidos, fueron seleccionados dos bacterias aisladas de semillas de chile serrano (*C. annuum* L.) CH05 y CH13 que lograron un 77.50%

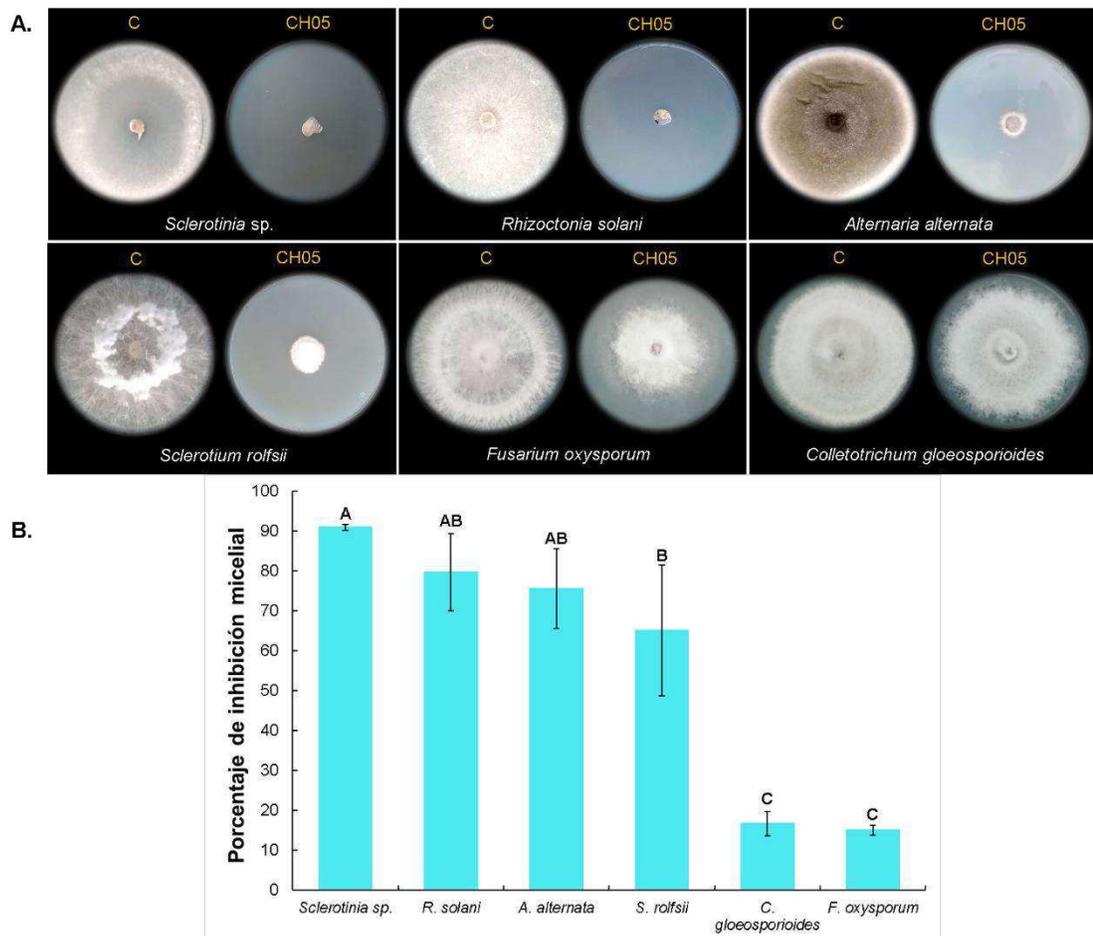
y 68.75%, de forma respectiva. Además, fueron seleccionados en base a su morfología y dado que las colonias CH05, CH10 y CH12 presentaban mismo fenotipo, se eligió CH05.



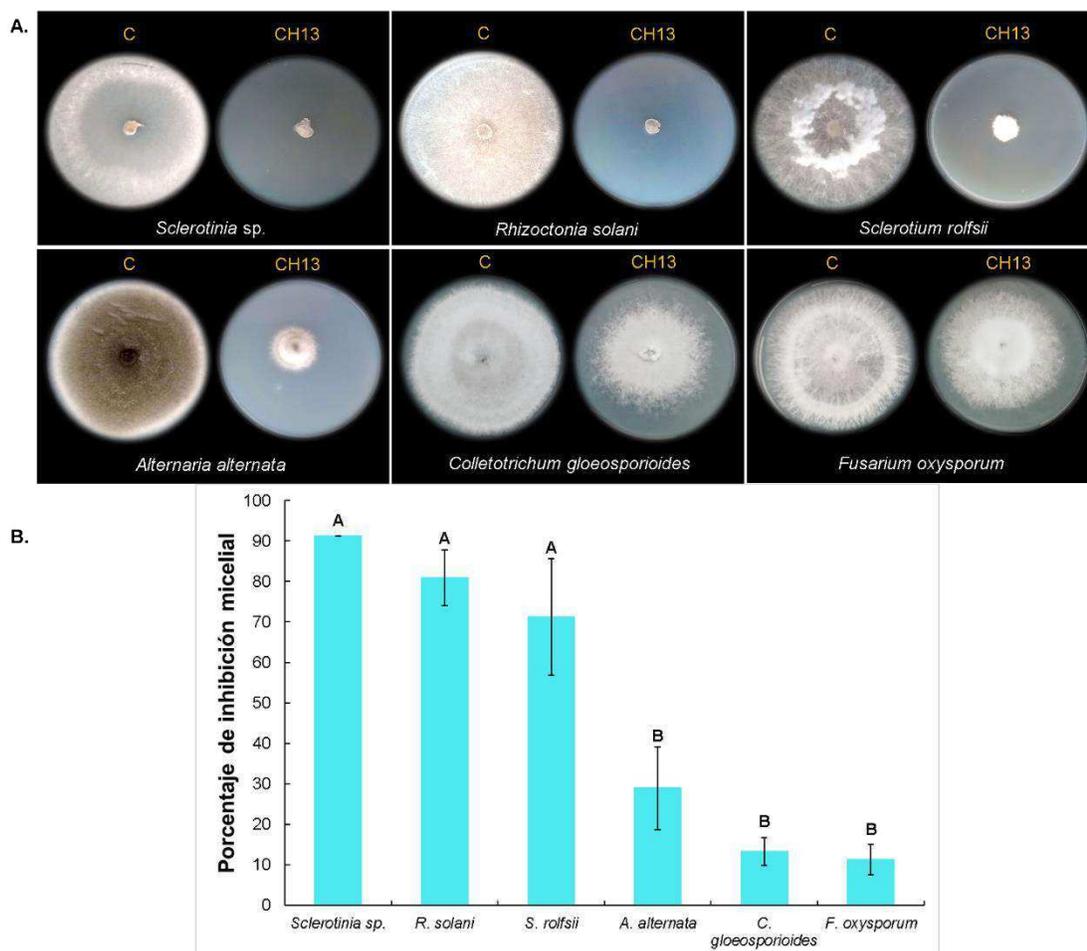
**Figura 13. Actividad antagonista de diez aislados bacterianos contra *S. rolfsii*.**  
**A.** Inhibición del crecimiento radial del hongo. C, representa el control sin tratamiento. **B.** Porcentaje de inhibición micelial de cada uno de los aislados probados.

Los aislados seleccionados, CH05 y CH13 se siguieron evaluando su efecto antagónico contra cinco hongos patógenos más; *Sclerotinia* sp., *R. solani*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* (Figura 14 y 15). Se utilizó la fórmula (1) descrita en la sección 5.4 con el cual, se calcularon los porcentajes de inhibición

micelial. De acuerdo a la figura 14, se indica que el aislado CH05, logró los siguientes porcentajes de inhibición del crecimiento micelial con un 90.83%, 79.58%, 75.46%, 65%, 16.62% y 15% hacia *Sclerotinia* sp., *R. solani*, *A. alternata*, *S. rolfsii*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, respectivamente. Con respecto a la figura 15, se puede observar que CH13 demostró los siguientes porcentajes de inhibición; 91.25%, 80.83%, 71.25%, 28.88%, 13.2% y 11.25% contra *Sclerotinia* sp., *R. solani*, *S. rolfsii*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*, respectivamente.



**Figura 14. Actividad antifúngica *in vitro* del aislado CH05. A.** Inhibición micelial de los controles sin tratamiento (C) y con tratamiento (aislado CH05). **B.** Indica los porcentajes de inhibición micelial (%). Análisis de ANOVA de una sola vía y prueba Tukey ( $P < 0.05$ ).

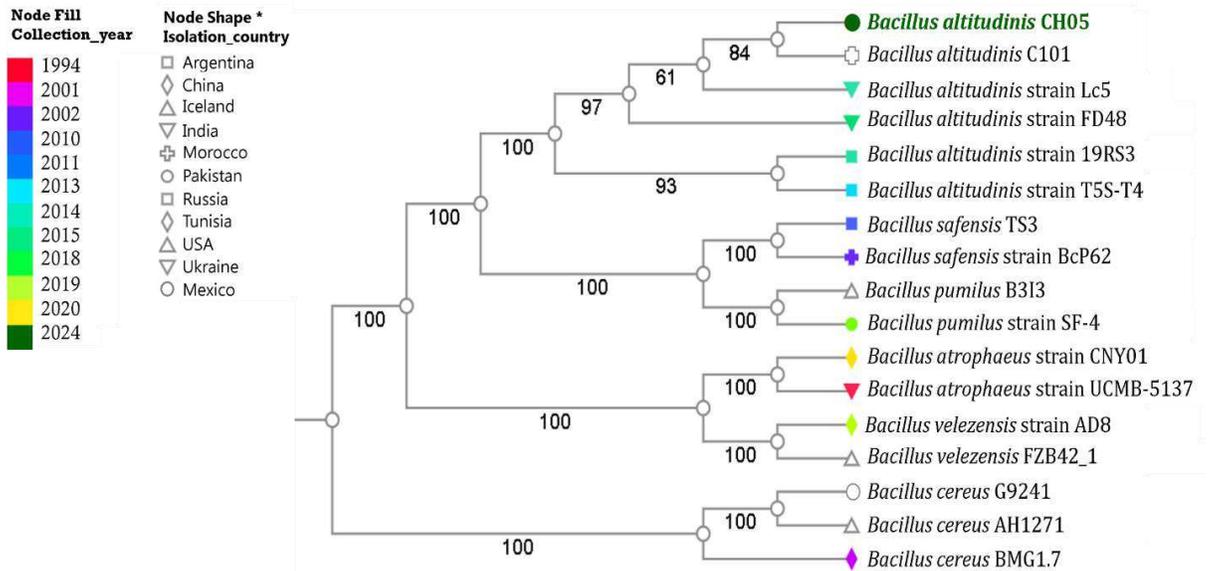


**Figura 15. Actividad antifúngica *in vitro* del aislado CH13. A.** Efecto inhibitorio micelial que incluye a los controles sin tratamiento (C) y aquellos con tratamiento (aislado CH13). **B.** Porcentajes de inhibición micelial radial (%). Análisis ANOVA de una sola vía y prueba de Tukey,  $P < 0.05$ .

#### 6.4. Identificación de los aislados bacterianos

La identificación de ambas cepas, *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13 se realizó por medio del análisis filogenómico basado en 100 genes núcleos de una sola copia y con el uso de la plataforma denominada centro de recursos bioinformática bacteriana y viral (BV-BRC; por sus siglas en inglés, BACTERIAL AND VIRAL BIOINFORMATICS RESOURCE CENTER). En la figura 16, se puede notar que *B. altitudinis* CH05 muestra alta similitud con la cepa *B. altitudinis* C101, además, tiene

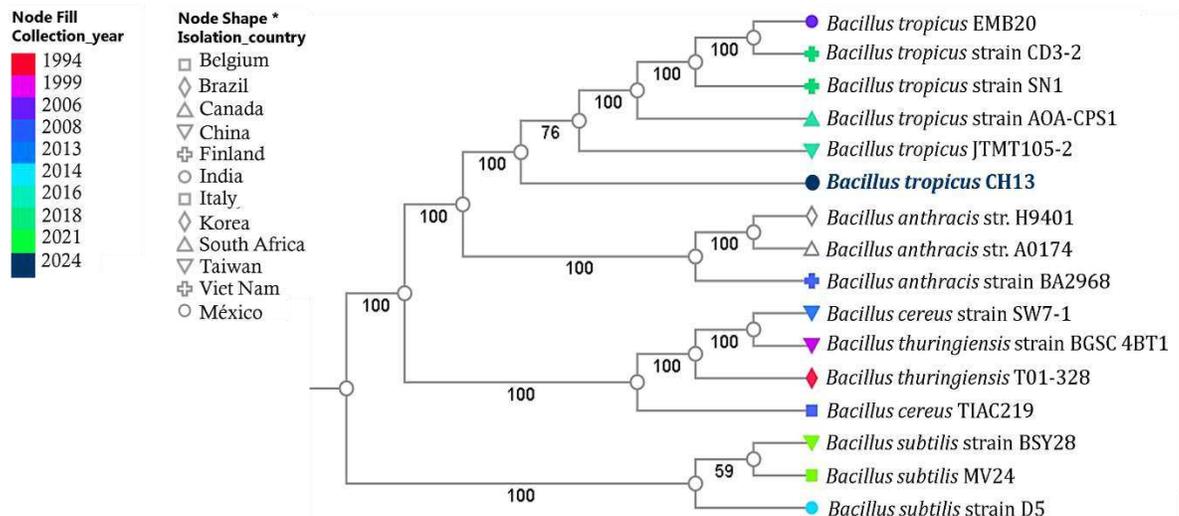
estrecha relación con otras cepas de la misma especie agrupadas en el mismo clado; *B. altitudinis* strain Lc5, *B. altitudinis* strain FD48, *B. altitudinis* strain 19RS3 y *B. altitudinis* strain T5S-T4. Por otra parte, *B. altitudinis* CH05 tiene relación con otras especies bacterianas, entre las que se pueden observar en la figura 14, son; *B. safensis* TS3, *B. safensis* strain BcP62, *B. pumilus* B313, *B. pumilus* strain SF-4, *B. atrophaeus* strain CNY01, *B. atrophaeus* strain UCMB-5, *B. velezensis* strain AD8 y *B. velezensis* FZB42\_1. Las diferentes especies descritas anteriormente incluyendo *B. altitudinis*, pertenecen al grupo de *B. subtilis*, lo cual puede explicarse su estrecha relación agrupados en el mismo clado. Sin embargo, el subgrupo agregado de *B. cereus*, puede observarse que no presenta cercanía con *B. altitudinis* CH05.



**Figura 16. Análisis filogenético de *B. altitudinis* CH05 mediante el uso de la plataforma BV-BRC.** Los colores representan el año del aislamiento de las cepas bacterianas y la forma del nodo, el lugar. Entre los países están; Argentina, China, Islandia, India, Marruecos, Pakistán, Rusia, Túnez, Estados Unidos, Ucrania y México.

En la figura 17, se puede contemplar las diferentes cepas bacterianas de la misma especie que tienen cercanía con *B. tropicus* CH13, entre los que se incluyen; *B. tropicus* EMB20, *B. tropicus* strain CD3-2, *B. tropicus* strain SN1, *B. tropicus* strain

AOA-CPS1 y *B. tropicus* JTM105-2. También, resaltar que *B. tropicus* pertenece al grupo de *B. cereus* que abarca todas las especies que se encuentran representadas en el árbol filogenético y, por lo tanto, su cercanía con la cepa identificada a excepción de *B. subtilis*. Entre las especies bacterianas relacionadas con la cepa de *B. tropicus* CH13, se encuentran; *B. anthracis* st. H9401, *B. anthracis* st. A01174, *B. cereus* strain SW7-1, *B. thuringiensis* strain BGSC 4BT1, *B. thuringiensis* T01-328, *B. cereus* TIAC219. No obstante, se añadió un subgrupo con el cual no refleja parentesco, *B. subtilis* strain BSY28, *B. subtilis* MV24 y *B. subtilis* strain D5.



**Figura 17. Análisis filogenético para *B. tropicus* CH13 mediante el uso de la plataforma BV-BRC.** Los colores indican el año de aislamiento de las cepas bacterianas y la forma del nodo, hace alusión al lugar. Los países que se muestran, son; Bélgica, Brasil, Canadá, China, Finlandia, India, Italia, Corea, Sudáfrica, Taiwán y México.

## 6.5. Análisis genómico de *B. altitudinis* y *B. tropicus*

### 6.5.1. Descripción genómico y subsistemas de *B. altitudinis* CH05

Se realizó el análisis de los genomas para cada una de las cepas bacterianas identificadas; *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13. En base al servicio de análisis PATRIC, se encontró que *B. altitudinis* CH05, contiene 18 contigs, una longitud

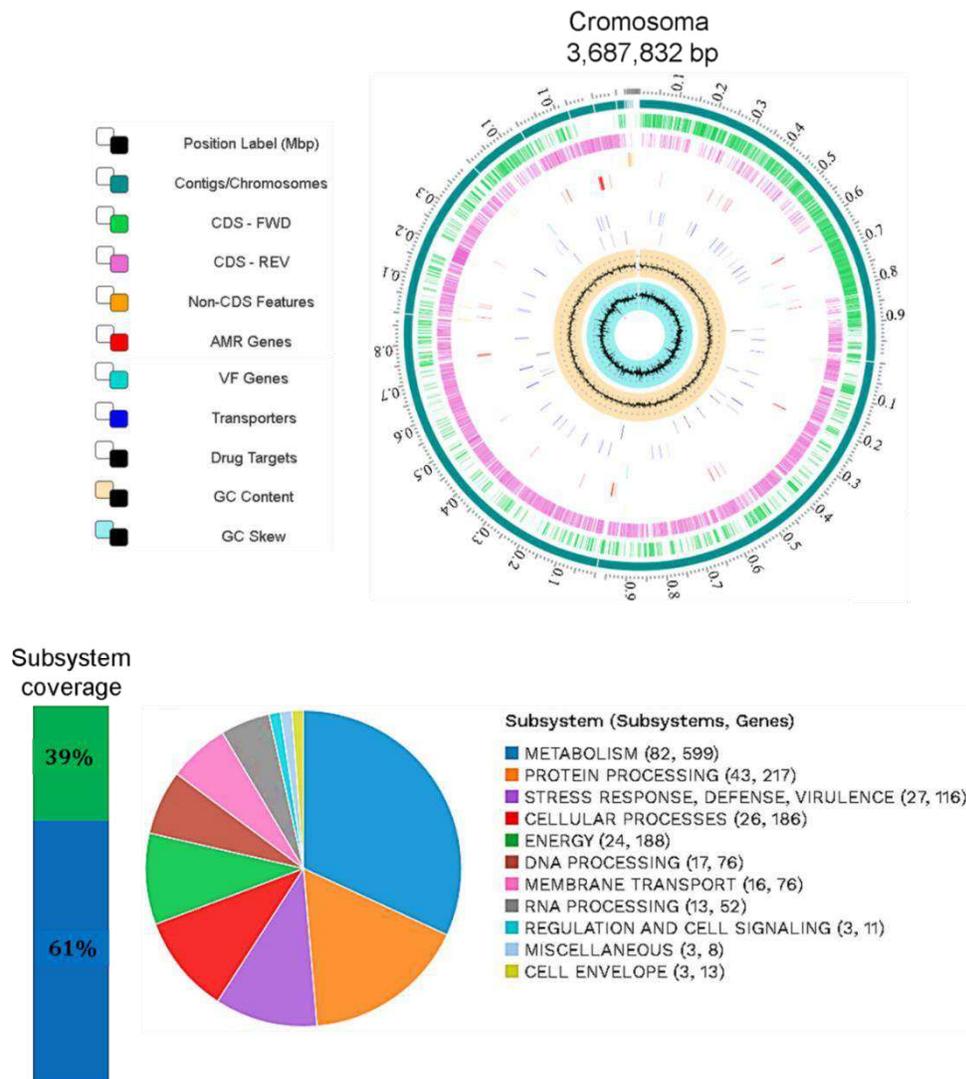
estimada de 3, 687, 876 pares de base (pb) y un promedio de 41.25 % de G+C. Contiene la longitud N50 el cual se describe como la longitud de secuencia más corta al 50% del genoma, siendo un valor de 973,716 pb y L50 que hace referencia al número más pequeño de contigs cuya suma de longitudes produce N50 (2). En adición, el genoma fue anotado mediante el kit de herramienta RAST (RASTtk) y le fue asignado un identificador único de 1386.3092. También contiene 3, 894 secuencias de proteínas codificantes (3, 894), 68 genes de transferencia (ARNt) y 3 ARN ribosomal (CDS, por sus siglas en inglés, protein coding sequences) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características generales del genoma de *B. altitudinis* CH05.

<b>Características</b>	<b>Fuente</b>	<b>Cromosoma</b>
Tamaño del genoma	PATRIC	3,687,832
Número de contigs	PATRIC	18
Secuencias de proteínas codificantes (CDS)	PATRIC	3, 894
Número de proteínas caracterizadas	PATRIC	3050
Número de proteínas putativos/hipotéticas	PATRIC	844
Número de genes ARNr	PATRIC	3
Número de genes ARNt	PATRIC	68
Número de proteínas con anotación de ruta	KEGG	683
G + C %	PATRIC	41.25
N50 tamaño del contig (pb)	PATRIC	973, 713
Factores de virulencia	Victors	2
Genes de resistencia a antibióticos	PATRIC	40
Genes transportadores	TCDB	65
Genes diana de fármacos	DrugBank	21

En la figura 18 y 19, se puede observar la distribución gráfica referente a las anotaciones de los genes que incluyen; los contigs, genes ARN, CDS con homología a genes de resistencia a antibióticos conocidos, CDS con homología a factores de virulencia conocidos y contenido de guanina y citosina (GC). Además, los colores de los CDS sobre las cadenas forward y reverse, representan los subsistemas a los cuales pertenecen los genes. Así mismo, se representa el

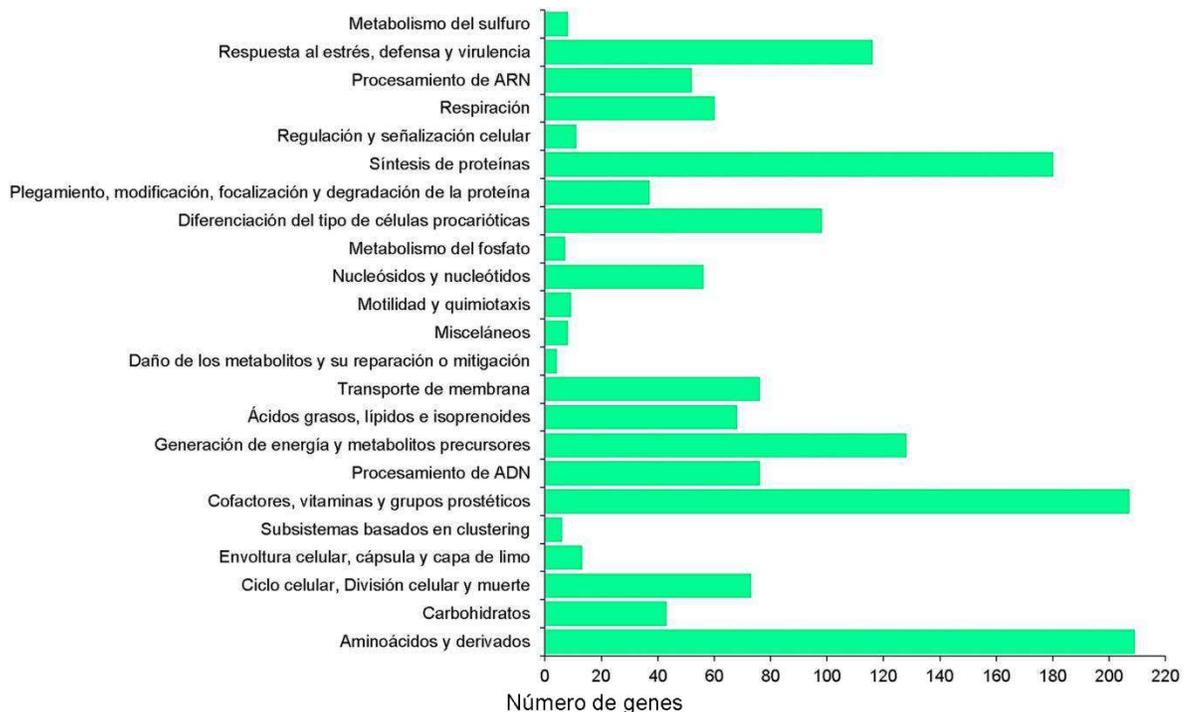
promedio en porcentaje referente a la asignación de los subsistemas ordenados por categoría en la cual; dentro del promedio de los subsistemas para *B. altitudinis* CH05, el 39% de ellos contiene un total de 1545 genes (1542 no hipotéticos y 3 hipotéticos) mientras que el 61%, señala a los no indicados dentro de la cantidad de los subsistemas con un total de 2420 genes (1574 no hipotéticos y 846 hipotéticos) (Figura 18).



**Figura 18.** Representación del mapa genómico circular y distribución de los subsistemas de *B. altitudinis* CH05.

La anotación funcional del genoma de *B. altitudinis* CH05, se basó en la fuente de PATRIC y se identificaron 1, 545 genes que codifican para una variedad de

procesos celulares, señalización de la célula, regulación y rutas metabólicas que ocurren a nivel celular y metabólico (Figura 19). Algunos de los que tuvieron mayor cantidad de genes, fueron; respuesta al estrés, defensa y virulencia (116 genes), síntesis de proteínas (180), generación de energía y metabolitos precursores (128), aminoácidos y derivados (209), carbohidratos (43), transporte de membrana (76), procesamiento de ADN (76), procesamiento de ARN (52), etc.



**Figura 19. Clasificación de los subsistemas por categoría.** Conteo de los procesos metabólicos que ocurren a nivel celular para *B. altitudinis* CH05.

### 6.5.2 Descripción del genoma y subsistemas de *B. tropicus* CH13

De acuerdo al análisis completo del genoma de *B. tropicus*, contiene 54 contigs con una longitud estimada de 5, 283, 801 pares de base (pb) y un contenido promedio de guanina-citosina de 35.24%. La longitud denominada N50 (el cual está definida como la longitud más corta de la secuencia al 50% del genoma), es de 381, 948 pb.

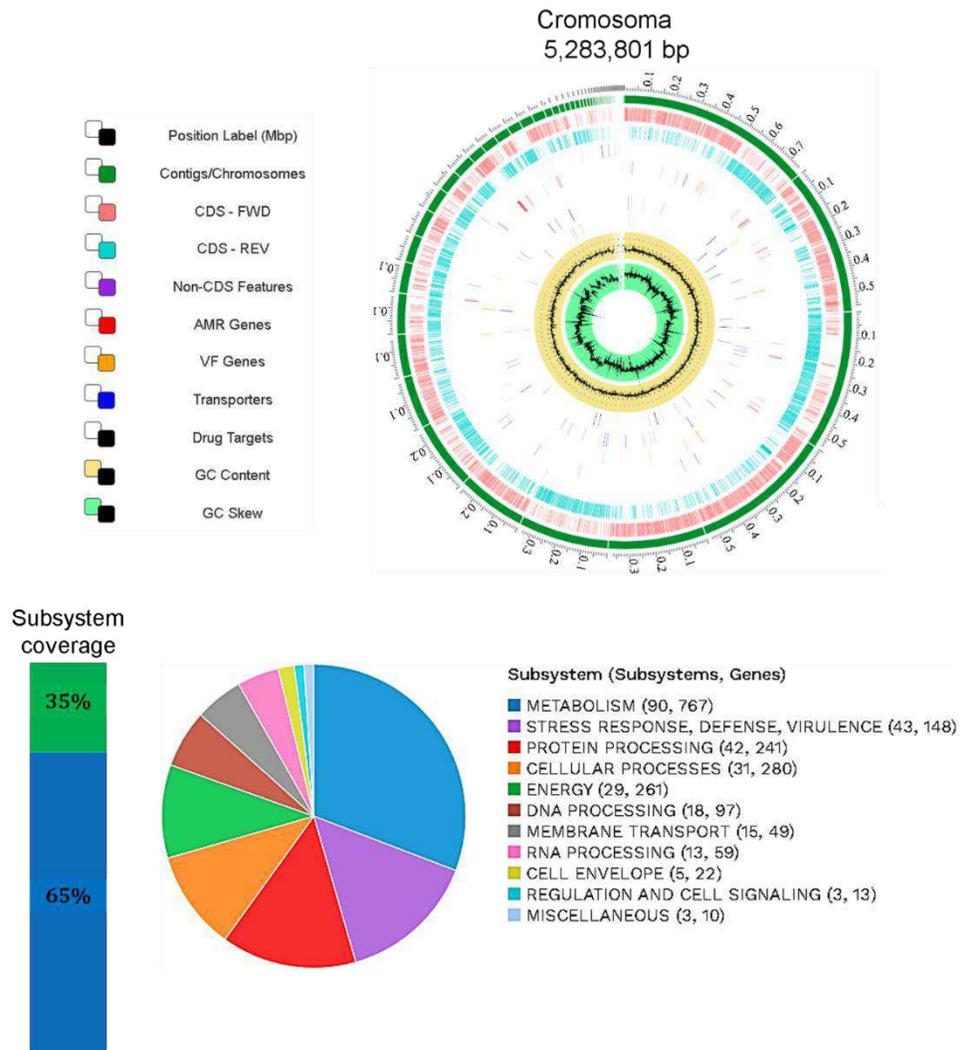
Además, el genoma de *B. tropicus* fue anotado utilizando el kit de herramientas RAST (RASTtk) y mediante el cual se le asignó un número de identificador de genoma único, 2026188.85. Según datos proporcionados por RASTtk, el genoma tiene 5,508 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 73 genes de ARN de transferencia (ARNr) y 4 genes ARN ribosomal (ARNr) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Características generales del genoma de *B. tropicus* CH13.

<b>Características</b>	<b>Fuente</b>	<b>Cromosoma</b>
Tamaño del genoma	PATRIC	5, 283, 728
Número de contigs	PATRIC	54
Número de proteínas caracterizadas	PATRIC	4, 265
Número de proteínas putativos/hipotéticas	PATRIC	1, 243
Número de genes ARNr	PATRIC	4
Número de genes ARNt	PATRIC	73
Número de proteínas con anotación de ruta	KEGG	830
G + C %	PATRIC	35.24
N50 tamaño del contig (pb)	PATRIC	381, 948
Factores de virulencia	Victors	12
Genes de resistencia a antibióticos	PATRIC	48
Genes de resistencia a antibióticos	CARD	7
Genes de resistencia a antibióticos	NDARO	5
Genes transportadores	TCDB	52
Genes diana de fármacos	DrugBank	28

En adición, a través de la herramienta de PATRIC, se obtuvo una anotación de las proteínas que conforman los subsistemas únicos para cada uno de los genomas de las cepas identificadas. Dichas proteínas están especializadas en diversos procesos biológicos a nivel molecular y celular (Figura 20 y 21). Agregando a lo anterior, *B. tropicus* CH13 reveló el promedio de los subsistemas en donde el 35 % de ellos contiene un total de 1947 genes (1946 son no hipotéticos y 1 hipotético) y el 65%

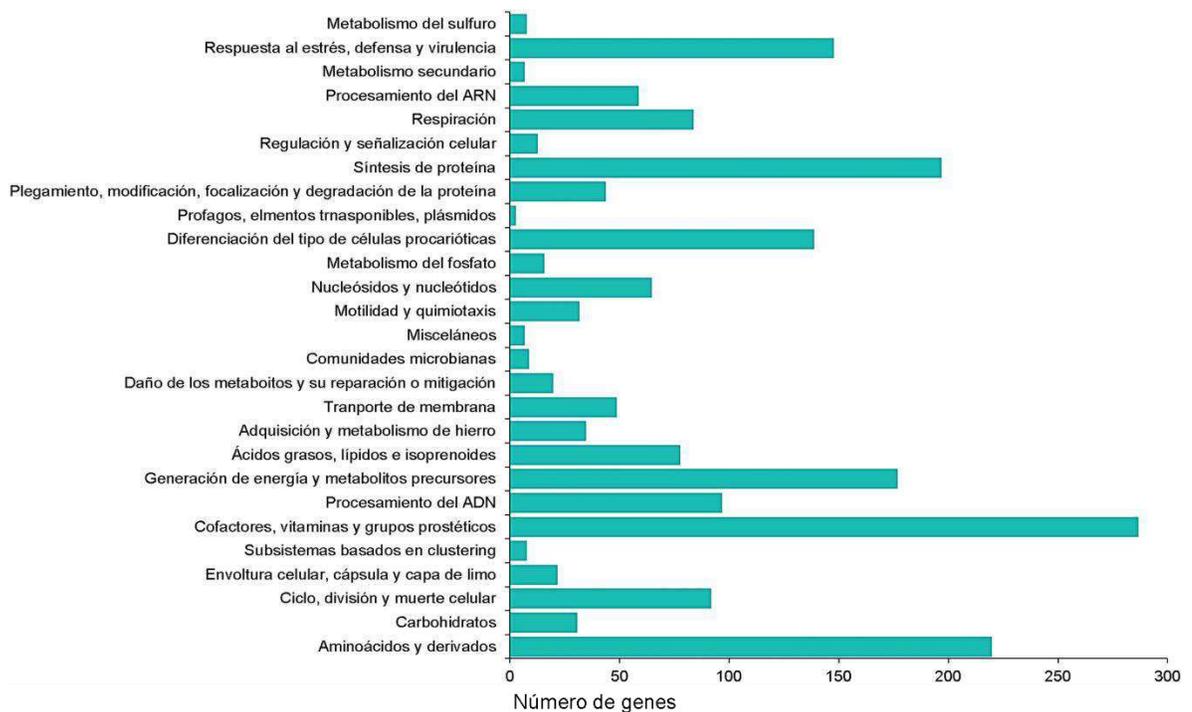
de ellos, son los que no están dentro de los subsistemas siendo un total de 3638 genes (2394 no hipotéticos y 1244 hipotéticos) (Figura 20).



**Figura 20.** Representación del mapa genómico circular y distribución de los subsistemas de *B. tropicus* CH13.

Otro aspecto a considerar es la anotación funcional del genoma de *B. tropicus* CH13, en base a la fuente de PATRIC a través del cual, se determinó que contiene 1, 947 genes que codifican distintos procesos celulares, señalización de la célula, regulación y rutas metabólicas que ocurren a nivel celular y metabólico (Figura 21).

Entre algunos subsistemas que contiene la cepa de *B. tropicus* CH13, son; metabolismo y adquisición de hierro (35 genes), comunidades microbianas (9), carbohidratos (31), metabolismo secundario (7), respuesta al estrés, defensa y virulencia (148), síntesis de proteínas (197), procesamiento del ARN (59), metabolismo del fosfato (16), transporte de membrana (49), motilidad y quimiotaxis (32), generación de energía y metabolitos precursores (177), metabolismo del sulfuro (8), procesamiento del ADN (97), entre otros.



**Figura 21. Conteo de los subsistemas por categoría.** Anotación de los diversos procesos metabólicos primordiales de *B. tropicus* CH13.

## 6.6. Identificación de genes que otorgan resistencia a antibióticos y virulencia de *B. altitudinis* y *B. tropicus*

Dentro del análisis genómico de *B. altitudinis* CH05, fueron definidos los genes de resistencia a antibióticos (GRA) basado por el método de detección k-mer y fueron asociados a los mecanismos de acción por el cuál actúan (Tabla 5). Ahora bien, es conveniente determinar el genotipo por medio de un fenotipo del AMR. En relación

a esto, el fenotipo AMR que se determinó en *B. altitudinis* CH05, evidenció resistencia a ampicilina (10 µg), amikacina (30 µg), carbenicilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), dicloxacilina (1 µg), ciprofloxacino (5 µg), clindamicina (30 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg), penicilina (10 U) y nitrofurantoína (300 µg). Entre los antibióticos que presentó sensibilidad intermedia, fueron: gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), vancomicina (30 µg) y norfloxacino (10 µg). Y únicamente presentó sensibilidad a tres antibióticos; tetraciclina (30 µg), netilmicina (30 µg) y cloranfenicol (30 µg). Con respecto a *B. tropicus* CH13, se observó resistencia hacia los antibióticos clindamicina y penicilina. Además, presentó sensibilidad intermedia a dos antibióticos; eritromicina y cloranfenicol. Sin embargo, exhibió sensibilidad a la mayoría de los antibióticos; dicloxacilina, vancomicina, tetraciclina, ampicilina, amikacina, carbenicilina, gentamicina, cefalotina, cefotaxima, netilmicina, ciprofloxacino, norfloxacino, sulfametoxazol/trimetoprim y nitrofurantoína.

**Tabla 5.** Identificación de genes de resistencia a antibióticos hallados en el genoma de *B. altitudinis* CH05.

<b>Mecanismo de resistencia a antibióticos</b>	<b>Genes</b>
Enzima de inactivación de antibióticos	familia CatA6 <i>Alr, Ddl, dxr, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p</i>
Diana antibiótica en especies susceptibles	<i>BcrC</i>
Proteína de protección antibiótico blanco	<i>fabL</i>
Proteína de reemplazo blanco de antibióticos	<i>BceA, BceB, EbrA, EbrB</i>
Bomba de eflujo confiere resistencia a los antibióticos	<i>GidB</i>
Gen que confiere resistencia por ausencia	<i>GdpD, MprF, PgsA</i>
Proteína de modificación de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos	<i>BceR, BceS, LiaF, LiaR, LiaS</i>
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos	

También, se identificaron aquellos genes que participan en la resistencia a antibióticos para el genoma de *B. tropicus* CH13 a través de diversos mecanismos representados en la tabla 6.

**Tabla 6.** Lista de genes de resistencia a antibióticos identificados en el genoma de *B. tropicus* CH13.

<b>Mecanismo de resistencia a antibióticos</b>	<b>Genes</b>
Enzima de inactivación de antibióticos	familia <i>Bcll</i> , familia <i>CatA15/A16</i> , <i>FosB</i>
Diana antibiótica en especies susceptibles	<i>Alr</i> , <i>Ddl</i> , <i>dxr</i> , <i>EF-G</i> , <i>EF-Tu</i> , <i>folA</i> , <i>Dfr</i> , <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , <i>Iso-ARNt</i> , <i>kasA</i> , <i>MurA</i> , <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>S10p</i> , <i>S12p</i>
Proteína de protección del objetivo antibiótico	<i>BcrC</i>
Proteína de reemplazo blanco de antibióticos	<i>YkkCD</i>
Bomba de eflujo confiere resistencia a los antibióticos	<i>GidB</i>
Gen que confiere resistencia por ausencia	<i>GdpD</i> , <i>MprF</i> , <i>PgsA</i>
Proteína de modificación de la pared celular y confiere resistencia a los antibióticos	VanXY-desclasificado
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos	<i>LiaF</i> , <i>LiaR</i> , <i>LiaS</i> , tipo-VanA/I/Pt

Además, se encontró que *B. tropicus* CH13 contiene algunos genes relacionados a la virulencia (Tabla 7), por ejemplo, las enterotoxinas, tales como; *nheA*, *nhB* y *nheC* que codifican los productos NheA, NheB y NheC, respectivamente, siendo parte del complejo NHE. Y los genes *hblA*, *hbl D* y *hbl C* que forman el complejo de las enterotoxinas HBL, resultado de un componente de unión (B) y dos componentes líticos (L1 y L2). Otro de los genes importantes relacionados a la virulencia es *cytK*, el cual se caracteriza por presentar similitud a la toxina  $\alpha$  de *S. aureus* y a la toxina  $\beta$  de *Clostridium perfringens* y se le atribuye como causante principal de intoxicación alimentaria por *B. cereus*. Por último, el gen *inhA* se ha determinado que otorga

resistencia al antibiótico isoniazida. Estos hallazgos revelan el grado de patogenicidad que puede tener la bacteria por efecto de los genes relacionados a la virulencia.

**Tabla 7.** Genes relacionados a la virulencia que contiene *B. tropicus* CH13 identificados por la fuente de VDFB.

<b>Mechanism of action</b>	<b>Gene</b>	<b>Product</b>
Toxina, toxin formadora de poros, PFT familia PFT de ClyA	<i>hblA</i>	Proteína hipotética
	<i>hblC</i>	Proteína hipotética
	<i>hblD</i>	Proteína hipotética
	<i>nheA</i>	Enterotoxina A no hemolítica
	<i>nheB</i>	Enterotoxina lítica componente L1 no hemolítica
	<i>nheC</i>	Enterotoxina C
Toxina, toxina formadora de poros,-PFT	<i>BAS3109</i>	Citolisina activada por tiol
	<i>cytK</i>	Proteína citolítica formadora de poros => Citotoxina K
Enzima, metaloproteasa	<i>inhA</i>	Inhibidor inmunológico A, metaloproteasa (EC 3.4.24.-)

En la cepa de *B. tropicus* CH13, se identificó veinte y seis genes relacionados a la motilidad y quimiotaxis; *cheV*, *cheR*, *cheY*, *fliH*, *flgD*, *flgB*, *flgC*, *flhA*, *flhB*, *fliP*, *fliQ*, *fliR*, *fliS*, *fliD*, *flgE*, *flgK*, *flgL*, *fliE*, *motA*, *motB*, *fliG*, *fliM*, *flinN*, *fliF*, *fliI* y *cheA*. Estos genes son de importancia para la bacteria ya que le otorgan la habilidad de colonizar la parte superficial de los tejidos de la planta o en las raíces, movilidad celular al dirigir la rotación flagelar lo que conlleva una completa colonización y, por último, aquellos genes implicados en la patogenicidad bacteriana como *fliH*, *fliI*, *fliN*, *fliR*, *flhA* y *fliH*B (factores de virulencia agrupados en el sistema de secreción T3SS).

## 6.7. Identificación de genes implicadas en la síntesis de acetoína y 2,3-butanodiol

En los genomas de *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13, se hallaron genes en común que se encuentran implicados en la ruta metabólica para la producción de los compuestos orgánicos volátiles; acetoína y 2, 3-butanodiol. Fueron un total de 6 genes; *bdhA*, que decodifica (2,3-butanodiol deshidrogenasa, formadora de alcohol R, específica de (R) y (S) acetoína; *ilvB*, cuyo producto que codifica es la subunidad grande de acetolactato sintasa; *ilvN*, el cual codifica la subunidad pequeña de acetolactato sintasa; *alsS*, cuyo producto es acetolactato sintasa, catabólica; *budA*, alfa-acetolactato descarboxilasa y *acoD*, dihidrolipoamida deshidrogenasa de acetoína deshidrogenasa.

## 6.8 Análisis e identificación de compuestos orgánicos volátiles (COV)

### 6.8.1 Caracterización de los COV producidos por *B. altitudinis* CH05

Con la finalidad de conocer el perfil de los compuestos orgánicos volátiles (COV) producidos por la cepa de *B. altitudinis* CH05, se aplicó la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME) acoplado con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). En base al análisis, fueron obtenidos en total 64 VOC producidos por *B. altitudinis* CH05 a un tiempo de fermentación de 24 h, de igual modo, notar que pertenecen a distintas clases de compuestos: 10 ácidos, 13 alcoholes, 10 aldehídos, 7 cetonas, 9 hidrocarburos, 2 nitrocompuestos, 8 pirazinas, 2 tioles, entre otros compuestos (Tabla 8).

**Tabla 8.** COV producidos por *B. altitudinis* CH05 detectados por HS-SPME-GC-MS.

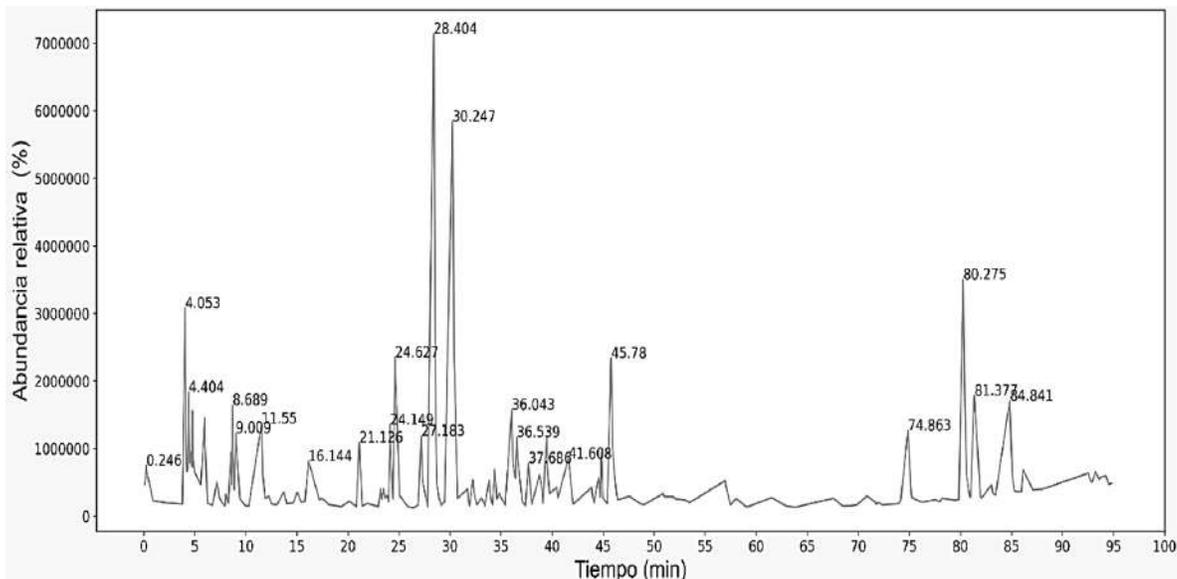
Compuesto orgánico volátil (COV)	Tiempo de retención (min)	Área de pico relativo (%)	Clase de compuesto
1,2, bis(difluoroamino)etano	0.246	1.03	Hidrocarburo

Dióxido de Carbono	4.053	2.13	Hidrocarbano
n-Hexano	4.404	2.29	Hidrocarbano
Metanotiol	4.648	0.73	Tiol
Acetaldehído	4.782	1.07	Aldehído
Heptano	4.903	2.78	Hidrocarbano
Acetona	5.988	1.04	Cetona
2-cloro-4,8-dimetilquinolina	7.144	0.46	Nitrocompuesto
Butanal	7.301	0.42	Aldehído
2-Butanona	7.963	0.61	Cetona
2-metilbutanal	8.526	0.66	Aldehído
3-metilbutanal	8.689	1.67	Aldehído
Etanol	9.009	1.36	Alcohol
2,3-butanodiona	11.55	2.24	Cetona
Tricloroetileno	12.247	0.36	Otro compuesto
Nafto[3,4:2,3]borneno	13.73	0.42	Otro compuesto
Tiolacetato de metilo	15.049	0.27	Tiol
Disulfuro de dimetilo	16.144	1.03	Otro compuesto
1-butanol	21.126	1.34	Alcohol
Alcohol 2-hidroxifenético	23.203	0.39	Alcohol
1-metil-4-(1-metiletilo)	23.464	0.68	Hidrocarbano
Ciclopentanona, - 2-etil-	23.817	0.36	Cetona
1,3-diazina	24.149	2.4	Nitrocompuesto
3-metil-1-butanol	24.627	4.43	Alcohol
Metilpirazina	27.183	2.24	Pirazina
Acetoína	28.404	11.9	Cetona
2-propanona, 1 hidroxil	28.926	0.2	Cetona
2,5-dimetilpirazina	30.247	13.31	Pirazina
Ácido oxálico, Derivado 2TMS	31.743	0.28	Ácido
1-hexanol	32.229	1.17	Alcohol
Trisulfuro de dimetilo	33.047	0.39	Otro compuesto
Pirazina, 2-etil-5-metil-	33.846	0.82	Pirazina
Pirazina, trimetil-	34.372	1.22	Pirazina
Nonanal	34.857	0.65	Aldehído
Ácido acético	36.043	2.02	Ácido
3-etil-2,5-dimetil-pirazina	36.539	2.68	Pirazina
4-heptanol, 2,6-dimetil	37.686	1.1	Alcohol
1-hexanol, 2-etil-	38.77	1.15	Alcohol

Ácido oxálico, Derivado 2TMS	38.993	0.27	Ácido
Benzaldehído	39.474	1.99	Aldehído
Pirazina, 2-metil-3-(2-propenil)	40.468	0.63	Pirazina
1-Octanol	41.608	1.62	Alcohol
Ácido pentanoico	43.864	0.44	Ácido
Bencenoacetaldehído	44.557	0.93	Aldehído
2-furanometanol	44.834	0.92	Alcohol
Ácido butanoico, 3-metilo	45.78	3.54	Ácido
Pirazina, 2,5-dimetil-3-(3-metilbutil)	46.143	0.69	Pirazina
1-Propanol, 3-(metiltio)	47.586	0.17	Alcohol
2-metoxi-3-1-metilpropilpirazina	50.85	0.58	Pirazina
Cloroformiato de nonilo	51.863	0.61	Otro compuesto
1-oxa-4-tiaespiro[4.4]nonano	56.958	1.15	Cetona
Alcohol de bencilo	58.039	0.27	Alcohol
Alcohol feniletílico	61.505	0.55	Alcohol
$\alpha$ -D-galactopiranosido de metilo	67.569	0.34	Hidrocarbano
4-metoxibenzaldehído	70.827	0.3	Aldehído
Ácido octanoico	74.863	2.46	Ácido
Ácido nonanoico	80.275	6.72	Ácido
Piperonal	81.377	2.14	Aldehído
Ácido 8-metilnonanoico	83.025	0.45	Ácido
Ácido n-decanoico	84.841	2.67	Ácido
2,4-Di-terc-butilfenol	86.147	0.5	Alcohol
D-manopiranososa	92.523	0.26	Hidrocarbano
Benzaldehído, 3-hidroxi-4-metoxi-	93.227	0.3	Aldehído
Éster isobutílico de hex-3-ilo del ácido ftálico	94.24	0.24	Otro compuesto

De acuerdo a la tabla 7, se describen los 64 COV, tiempo de retención (min), área de pico relativo (%) y la clase de compuestos en la cual se encuentran clasificados,

los compuestos de mayor abundancia relativa fueron; alcoholes, aldehídos, ácidos y pirazinas sintetizados por *B. altitudinis* CH05.



**Figura 22. Perfil cromatográfico de los COV producidos por *B. altitudinis* CH05.** Los picos más altos representan los COV de mayor abundancia relativa (%) a diferentes tiempos de retención (min).

En la figura 22, se puede observar el perfil de los compuestos de mayor abundancia relativa (%) a diferentes tiempos de retención (TR), entre los que se incluyen, son; acetoina (TR = 28.4), 2,5-dimetil pirazina con un (TR = 30.25), 3-metil-1-butanol (TR = 24.63), ácido butanoico, 3-metilo (TR = 45.78), ácido nonanoico (TR = 80.28), 3-butanol-metil (TR = 8.69), etanol (TR = 9.01), 2,3-butanodiona (TR = 11.55), 1-butanol (TR = 21.13), 1,3-diazina (TR = 24.15), metil-pirazina (TR = 27.18), 3-etil-2,5-dimetil-pirazina (TR = 36.54), benzaldehído (39.47), ácido octanoico (TR = 74.86), piperonal (TR = 81.38) y ácido n-decanoico (TR = 84.84).

### 6.8.2 Caracterización de los COV producidos por *B. tropicus* CH13

De igual manera, por medio del método de HE-SPME acoplado a GC-MS, se identificaron 53 COV sintetizados por la cepa de *B. tropicus* CH13, entre los

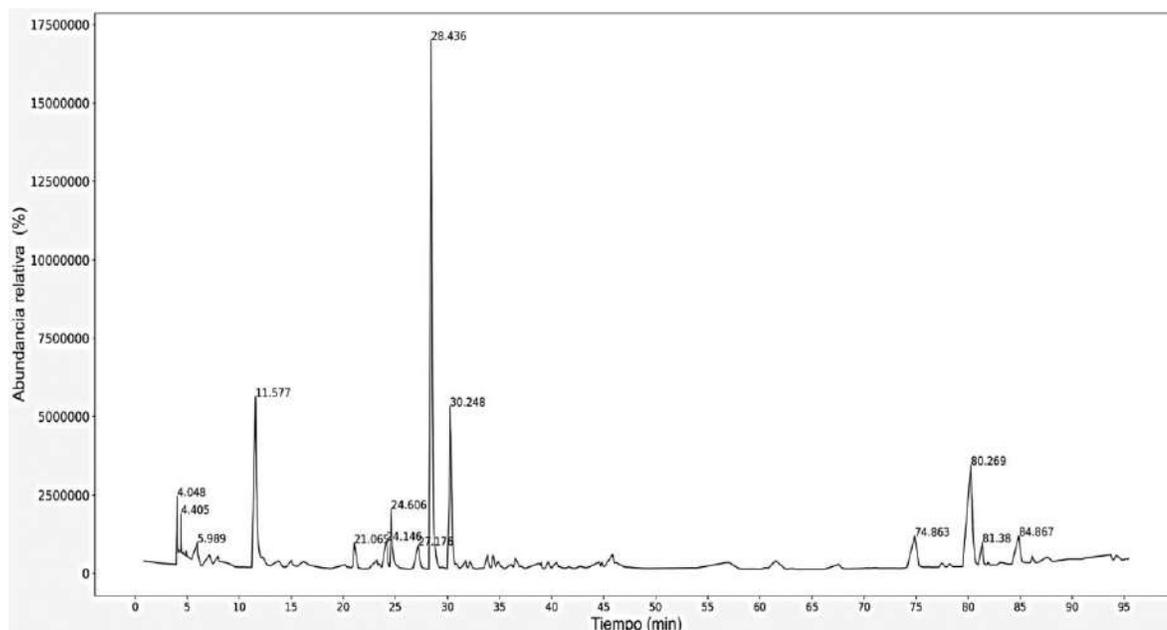
compuestos hallados, se incluyen; 6 ácidos, 5 alcoholes, 2 aldehídos, 8 cetonas, 5 esterés, 6 hidrocarburos, 5 nitrocompuestos, 8 pirazinas, 3 tioles, entre otros compuestos con diferentes tiempos de retención (Tabla 9).

**Tabla 9.** COV producidos por *B. tropicus* CH13 detectados mediante HS-SPME-CG-MS.

Compuesto orgánico volátil (COV)	Tiempo de retención (min)	Área de pico relativo (%)	Clase de compuesto
Dióxido de carbono	4.048	1.10	Hidrocarburo
Pentano	4.188	0.86	Hidrocarburo
n-Hexano	4.405	1.51	Hidrocarburo
Metanotiol	4.649	0.81	Tiol
Heptano	4.907	2.22	Hidrocarburo
Acetona	5.989	0.68	Cetona
2-cloro-4,8-dimetil-quinolina	7.146	0.90	Nitrocompuesto
2-Butanona	7.976	0.48	Cetona
2,3-Butanodiona	11.577	10.38	Cetona
Tricloroetileno	12.274	0.89	Hidrocarburo
2-mercapto-4-feniltiazol	13.771	0.45	Tiol
Éster etílico del ácido butanoico	15.028	0.33	Estér
Disulfuro de dimetilo	16.169	0.22	Otro compuesto
3-metil-1-butanol, acetato	20.175	0.20	Alcohol
1-Butanol	21.065	1.30	Alcohol
Hexametil- disilolano	23.248	0.22	Otro compuesto
1-metil-4-(1-metiletilo)	23.468	0.24	Hidrocarburo
1,3-Diazina	24.146	1.56	Nitrocompuesto
1-Pentanol	24.606	3.78	Alcohol
Metilpirazina	27.176	1.82	Pirazina
Acetoína	28.436	32.77	Cetona
Acetoína	28.91	0.69	Cetona
2,5-dimetilpirazina	30.248	12.33	Pirazina
2,5-dimetilpirazina	30.871	0.40	Pirazina
Ácido malónico, bis (2-trimetilsililetil éster	31.756	0.31	Estér

Éster etílico del ácido heptanoico	32.142	0.68	Estér
2-etil-5-metilpirazina	33.839	1.19	Pirazina
Trimetilpirazina	34.372	0.98	Pirazina
Nonanal	34.861	0.71	Aldehído
Ácido acético	36.155	0.18	Ácido
3-etil-2,5-dimetilpirazina	36.502	0.67	Pirazina
2-Etil-1-hexanol	38.749	0.51	Alcohol
Ácido oxálico, derivado 2TMS	39.003	0.22	Ácido
$\alpha$ -fenil-benzoacetonitrilo	39.678	0.62	Nitrocompuestos
2-metil-6-1-propenilpirazina	40.474	0.37	Pirazina
2-Acetilthiazole	44.591	0.29	Tiol
Acetofenona	44.855	0.21	Cetona
Serina	45.856	0.74	Otro compuesto
2,3-dimetil-5-isopentilpirazina	46.151	0.34	Pirazina
D-Serina $\beta$ -D-Ribopiranosido, metilo	57.003	0.70	Otro compuesto
Alcohol feniletíl	61.529	1.06	Alcohol
$\beta$ -1-arabinopiranosido, metilo	67.565	0.44	Otro compuesto
Ácido octanoico	74.863	2.35	Ácido
2-Nonadecanona	77.452	0.43	Cetona
11-Dodecen-2-ona	78.205	0.28	Cetona
Ácido nonaico	80.269	6.53	Ácido
Piperonal	81.38	1.17	Aldehído
Antranilato de metilo	81.916	0.15	Ácido
Ácido n-decanoico	84.867	1.67	Ácido
Pirido[3,4-d]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	86.145	0.34	Nitrocompuesto
2-etil-6-metil-piridina	87.601	0.23	Nitrocompuesto
Éster exadecilo del ácido 4-trifluorometilbenzoico	93.684	0.24	Estér
Éster bis(2-metilpropílico) del ácido 1,2-bencenodicarboxílico	94.242	0.27	Estér

En la tabla 8, se mencionan el nombre de los 53 COV identificados, tiempo de retención (min), área de pico relativo (%) y la clase de compuestos mayoritarios que fueron los siguientes: pirazinas, cetonas, ácidos, alcoholes y ésteres.



**Figura 23. Perfil cromatográfico de los COV producidos por *B. tropicus* CH13.** Los picos más altos representan los COV de mayor abundancia relativa (%) a diferentes tiempos de retención (min).

Y de acuerdo a los datos obtenidos para el tiempo de retención y abundancia relativa, se construyó el cromatograma el cual representa cada uno de los compuestos de mayor abundancia relativa identificados (Figura 23). Entre los principales compuestos de mayor abundancia relativa que se identificaron a distintos tiempos de retención (min), fueron; 28.4 (acetoína), 30.248 (2,5-dimetilpirazina), 11.577 (2,3-butanodiona), 80.269 (Ácido nonaico), 24.606 (1-pentanol), 81.38 (Piperonal), 84.867 (Ácido n-decanoico), 4.405 (n-Hexano), 21.065 (1-Butanol), 27.176 (Metilpirazina), 33.839 (2-etil-5-metilpirazina) y 74.863 (Ácido octanoico).

## 7. DISCUSIÓN

Las semillas de algunas hortalizas, albergan microorganismos beneficios para la propia planta, como las bacterias del género *Bacillus* los cuales, recientemente han llamado la atención debido a su potencial que posee sobre la germinación, adquisición de nutrientes, desarrollo y crecimiento de la planta, además, poseen actividad de biocontrol contra hongos fitopatógenos de amplio espectro (Colman Massawe *et al.*, 2018). En esta presente investigación, se obtuvieron un total de 76 aislados bacterianos de semillas de chile (*Capsicum* spp.) que fueron obtenidos de diferentes regiones geográficas de México; Michoacán, Querétaro y Yucatán. Se caracterizaron dos cepas bacterianas aisladas específicamente del chile serrano (*C. annuum* L.) y que fueron identificados como *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13, basado en un análisis filogenómico de 100 genes núcleos mediante la plataforma BV-BRC. Ambas cepas mostraron actividad antifúngica utilizando seis fitopatógenos fúngicos (*Sclerotinia* sp., *R. solani*, *S. rolfsii*, *A. alternata*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*) de estudio. Estos resultados comprueban el efecto inhibitorio micelial que tienen las bacterias de *Bacillus* endófitos presentes en semillas de algunas hortalizas, como lo reportado por Khalaf y col. (2018), quienes aislaron una cepa de *Bacillus* aislada a partir de semillas vegetales de cucurbitáceas el cual, otorgo una respuesta de defensa contra el hongo patógeno *R. solani* mediante la producción de dos compuestos orgánicos volátiles (acetoína y diacetilo).

Además, se han identificado algunas cepas de *B. altitudinis* que poseen ciertos rasgos con actividades biológicas de importancia que contribuyen a la germinación, desarrollo y crecimiento de la planta, tales como: solubilización de minerales (zinc, fósforo y potasio), producción de sideróforos, actividad de proteasas, fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas (ejemplo, ácido indol acético, ácido giberélico y etileno), además, habilidad de biocontrol contra algunos fitopatógenos fúngicos de importancia agrícola y económica, entre los evaluados fueron; *R. solani*, *A. alternata* y *Fusarium* spp. (Liu *et al.*, 2017; Sun, *et al.*, 2021; Narayanasamy *et al.*, 2023). En base a esta información, resulta ser evidente ya que, en nuestro

trabajo de investigación, encontramos que *B. altitudinis* CH05, fue capaz de inhibir el crecimiento micelial de *R. solani* (79.58%) y *A. alternata* (75.46%). En adición, *B. altitudinis* y las especies cercanas que se representan en el árbol filogenético (Figura 16), se encuentran agrupadas con *B. subtilis*. Hay que enfatizar que la mayoría de ellos, han sido aislados de diferentes ambientes ecológicos; suelo, agua, en la parte superficial e interna de tejidos de las plantas que en general, son capaces de incrementar el rendimiento de los cultivos, promover el crecimiento de la planta, mejorar la resistencia ante el estrés biótico y abiótico y de tener actividad antagónica hacia organismos fúngicos (Chebotar *et al.*, 2023). Entre las especies bacterianas identificadas, están; *B. safensis*, *B. pumilus*, *B. atrophaeus* y *B. velezensis* con potencial de interés biotecnológico por sus diversas aplicaciones agroecológicas (en la formulación de bioinoculantes y bioplaguicidas), un claro ejemplo, es *B. velezensis* TSA32-1 que demostró tener un efecto inhibitorio antifúngico contra los hongos de *F. oxysporum*, *A. alternata* y *R. solani* de acuerdo a Kim y col. (2022). Existe otro reporte sobre bacterias endófitas aisladas en semillas de maíz (*Zea mays*) que fueron identificados como *B. velezensis* ZMW8 y *B. altitudinis* ZMW1, después de ser evaluados cualitativamente en condiciones *in vitro*, fueron capaces de promover el desarrollo y establecimiento de las plántulas de la propia hortaliza, además de dar defensa ante *R. solani* (Pal *et al.*, 2022). Otro ejemplo, *B. atrophaeus* CNY01, que fue aislado de la rizósfera de una planta de manzano (*Malus domestica* Borkh), se encontró que tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *A. alternata* un 54.5% (Bektas *et al.*, 2023). Y *B. safensis* STPJ que fue evaluada bajo condiciones *in vitro*, logró una inhibición de  $86.24 \pm 2.12\%$  hacia *A. alternata* (Prakash *et al.*, 2021), en comparación a la cepa de *B. altitudinis* CH05, fue de un 75.46% que resultó ser significativo. Bajo esta misma línea, se han encontrado cepas como *B. subtilis*, *B. siamensis* PDA 10, *B. amyloliquefaciens* 1034, *B. velezensis* FZB42165 y *B. atrophaeus* NBRC con potencial inhibitoria contra *S. rolfsii*, sin embargo, únicamente *B. atrophaeus* exhibió un rango de inhibición alta entre un 58 y 93.7% (Kumari *et al.*, 2021).

Por otro lado, *B. tropicus* CH13, el análisis filogenético (Figura 17) indica que tiene estrecha cercanía con otras cepas de la misma especie que han exhibido actividad antagonista, por ejemplo, las cepas de *B. tropicus* CD3-2 y *B. tropicus* SN1 (aisladas a partir de plantas de cultivo saludables en Vietnam), lograron inhibir el crecimiento micelial de *Phytophthora palmivora* y *F. oxysporum*, además, se encargaron de promover el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Vater *et al.*, 2023). Adicionalmente, en el análisis filogenético (Figura 13) se representan otras especies cercanas a *B. tropicus* CH13, entre los que se incluyen; *B. anthracis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*. Diversas cepas de *B. cereus* han sido estudiados debido a su habilidad antagónica contra hongos fitopatógenos. Recientemente, caracterizaron una cepa de *B. cereus* sp. UW85 que fue aislado de las raíces de alfalfa (*Medicago sativa* L.), logró demostrar potencial antifúngica contra tres hongos que se transmiten a través del suelo: *Pythium aphanidermatum*, *R. solani* y *F. oxysporum* (Moshe *et al.*, 2023). Hasta ahora, es el primer reporte que se tiene sobre una especie de *B. tropicus* aislado a partir de semillas de chile (*C. annuum* L.) con habilidad de inhibir el crecimiento micelial de hongos fúngicos que se estudiaron en esta investigación. No obstante, existe otro antecedente sobre la actividad de biocontrol que evidenció una cepa de *B. tropicus* CAB-L005 aislada en la rizosfera de un plantío de areca taro (*Colocasia esculenta* L.) en China, en el cual, se encontró que fue capaz de reducir el crecimiento de una bacteria patógena denominada *Pectobacterium carotovorum* subsp, *Carotovorum* que es causante de una enfermedad muy común denominado pudrición blanda y que afecta principalmente el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (Dong *et al.*, 2021). Además de eso, algunas investigaciones han revelado atributos notables que han contribuido al mejoramiento de la fertilidad del suelo, salud de la planta, desarrollo, crecimiento y rendimiento de la planta por la aplicación de ciertas cepas de *B. tropicus*. Como es el caso de *B. tropicus* WHS48 el cual, fue obtenido de muestras de suelo y agua, se caracterizó como una bacteria promotora de crecimiento vegetal al incrementar el rendimiento de producción de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Egipto de acuerdo a lo reportado por Abdelall y col. (2023). Aunado con esto, tienen la facultad de conferir resistencia y tolerancia

ante condiciones hostiles, entre los que podemos mencionar; sequía, salinidad, suelos contaminados con metales pesados, temperaturas y pH altos como bajos para favorecer el cultivo de algunas hortalizas de importancia económica y de mayor consumo como es el maíz (*Zea mays* L.) (Azeem *et al.*, 2022; Negi *et al.*, 2023).

En nuestro trabajo de investigación, encontramos que el genoma de *B. altitudinis* CH05 contiene algunos genes de resistencia a antibióticos relevantes que codifican para los productos de bacitracina (*BceA*, *BceB*), proteínas resistentes a multifarmacos (*EbrA*, *EbrB*) y cloranfenicol (familia *CatA6*). En teoría, estos genes podrían estar implicados en la supervivencia de la cepa bacteriana en un ambiente competitivo y que, además, han sido detectados también en *B. altitudinis* FD48, aislado de la rizosfera de una planta de arroz (Narayanasamy *et al.*, 2023). De acuerdo a la fuente PATRIC, *B. tropicus* CH13 contiene el gen de resistencia a antibióticos, la familia *BclI* que produce beta-lactamasa Subclase B1 de amplio espectro con capacidad de hidrolizar un gran número de antibióticos. Se sabe que las cepas del grupo de *B. cereus*, por lo común, son resistentes a los antibióticos de  $\beta$ -lactamasa (Fiedler *et al.*, 2019) lo cuál, explicaría la resistencia que presento *B. tropicus* CH13 hacia clindamicina y penicilina en la prueba de resistencia a antibióticos.

También, se encontró que *B. tropicus* CH13 posee genes asociados a la virulencia cuyo mecanismo de acción es mediante la producción de toxinas. Entre los genes identificados, fueron; *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC* y *cytK*. Al respecto, se ha reportado la detección de secuencias de estos genes con alta frecuencia en otras cepas bacterianas que forman parte del grupo de *B. cereus sensu lato (s.l.)*; *B. weihenstephanensis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. mycoides* y *B. anthracis*. Sin embargo, la prevalencia del gen *cytK* fue bajo ya que sólo se detectó en dos cepas. Todas las cepas fueron aisladas de productos frescos como; pepino, zanahoria, hierbas, hojas de lechugas y especias. La prevalencia de los genes mencionados anteriormente, es un factor de riesgo para la salud pública ya que se caracterizan por alterar la calidad de los alimentos provocando algunas

enfermedades gastrointestinales (como diarrea o intoxicación alimentaria) o infecciones clínicas (bacteriemia, infección del sistema nervioso central o respiratorias) (Fiedler *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2018). En adición, se identificaron algunos genes asociados con la motilidad y quimiotaxis de los cuales, ya han sido reportados por sus actividades que desempeñan. Entre los que se incluyen, son; *cheR*, *cheB*, *cheA*, *motA*, *motB*, *fliG*, *fliM* y *fliN* que se ha determinado su participación en la ruta de la quimiotaxis bacteriana mientras que los genes *cheR*, *fliG*, *motB*, fue llevado a cabo su expresión en conjunto con la adición de ácido cítrico, favoreciendo la actividad fisiológica de la cepa *B. altitudinis* LZP02 ya que aseguró la colonización de los exudados de las raíces de arroz (*Oriza sativa* L.), así como la germinación de las semillas y crecimiento de la planta de arroz (Jiao *et al.*, 2022; Narayanasamy *et al.*, 2023).

Otro tema a resaltar, es el biocontrol de hongos fúngicos mediante la acción de los COV sintetizados por especies de *Bacillus*. Entre los compuestos de mayor abundancia relativa que fueron sintetizados por *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13, fueron; acetoína, 2,5-dimetilpirazina, 3-metil-1-butanol, ácido 3-metilbutanoico, ácido nonanoico, 3-butanol-metil, etanol, 2,3-butanodiona, 1-butanol, 1,3-diazina, metilpirazina, 3-etil-2,5-dimetil-pirazina y benzaldehído. Al respecto, se ha reportado que una cepa de *B. amyloliquefaciens* UCMB5113, entre los principales COV que produjo mayoritariamente, fueron; acetoína, 2,3-butanodiona, metilpirazina y 2,5-dimetilpirazina, también, estos compuestos mostraron un efecto inhibitorio eficiente sobre el crecimiento de algunos fitopatógenos, tales como; *B. cinérea*, *S. sclerotiorum*, *Alternaria brassicae* y *V. longisporum* (Asari *et al.*, 2016). Otro de los compuestos de mayor producción que se ha evidenciado por una cepa de *B. altitudinis* B1-15 (obtenido de una muestra de un suelo alcalino), es el ácido 3-metilbutanoico (Song *et al.*, 2023). Entre otros COV de mayor abundancia relativa producidas por *B. altitudinis* CH05; 1-butanol y acetoína. Hay evidencia de que estos dos compuestos son producidos principalmente por otras especies bacterianas de *Bacillus* y que han demostrado

tener actividad antifúngica, como ejemplo, *B. velezensis* G341 el cual, logró inhibir el crecimiento micelial del hongo *R. solani* un 63%, también fue probado en otros dos hongos; *Sclerotinia sclerotiorum* y *B. cinérea* mostrando un 78 y 58% de inhibición, respectivamente (Lim *et al.*, 2017). Estos datos sugieren la efectividad del antagonismo que poseen los COV producidos por algunas especies de *Bacillus*. En adición, otros compuestos producidos por ambas cepas, son aquellos derivados de la pirizina el cual, se caracteriza por ser un compuesto heterocíclico y existen hallazgos acerca de su capacidad inhibitoria sobre el crecimiento micelial contra ciertos hongos de importancia agrícola, tales como; *B. cinérea* y *R. solani*. También, se les ha atribuido la función de prevenir las enfermedades provocadas por los hongos en las plantas y ha sido comprobado su efectividad contra *A. alternata* en comparación con aquellos compuestos derivados de alcoholes (Prakas y Arora, 2021). En adición, hay evidencias sobre la producción y abundancia del compuesto 2,5-dimetilpirazina por más especies bacterianas que pertenecen al grupo de *B. subtilis* con actividad de biocontrol tales como; *B. subtilis* TRC7, *B. altitudinis* TRC10 y *B. megaterium* TRT11 los cuales, fueron capaces de suprimir el crecimiento micelial de *R. solani* analizado en plántulas y fruto del jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Marzouk *et al.*, 2021).

## 8. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, se demostró que las semillas de *Capsicum* albergan bacterias del género *Bacillus* con actividad antifúngica. Fueron identificados dos aislados bacterianos como *B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13.

El análisis genómico de ambas cepas bacterianas, se determinó que contienen genes de resistencia a antibióticos y genes relacionados con la virulencia. Además, la detección de aquellos genes que participan en la síntesis de acetoina y 2,3-butanodiol.

*B. altitudinis* CH05 y *B. tropicus* CH13 producen compuestos orgánicos volátiles (COV), entre los compuestos mayoritarios que fueron identificados en ambas cepas fueron; acetoina, 2,5-dimetilpirazina, 1-butanol, benzaldehído, 3-metil-1-butanol, ácido 3-metilbutanoico, ácido nonanoico, etanol, 2,3-butanodiona, 1,3-diazina, ácido acético y metilpirazina los cuales, se cree que pueden estar implicados en la inhibición micelial de los hongos fitopatógenos.

## **8. PERSPECTIVAS**

De acuerdo a los resultados generados, sería interesante seguir investigando sobre bacterias presentes en semillas de otras variedades de Chile, al menos en México, se cuenta con una vasta diversidad de especies de *Capsicum* y considerando que hay escasa información sobre ello, es necesario su estudio. Y al mismo tiempo determinar sus principales actividades antimicrobianas que desempeñan, ya sea en el biocontrol de hongos fitopatógenos o algún otro rasgo que contribuya en el desarrollo y crecimiento de alguna hortaliza de interés, lo cual, representa una alternativa biológica amigable y sustentable hacia el ambiente.

## 10. REFERENCIAS

**Abdelall** M F, El-Gamal S, Atef H, Tawfik M S. (2023). Impact of some Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) con Potato Plants under Salt Stress. Egypt Acad. J. Biolog. Sci. 15(2):119-132. <http://doi.org/10.21608/EAJBSG.2023.327377>

**Athukorala** S N P, Fernando W G D, Rhasid K Y. (2009). Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. 55: 1021-1032. <https://doi.org/10.1139/W09-067>

**Altamira** F, Godoy S, Arias-Aravena M, Araya B, Montes C, Castro F A, Dardon E, Montenegro E, Pineda W, Viteri I, Tapia E. (2022). Genomic and Experimental Analysis of the Biostimulant and Antagonistic Properties of Phytopathogens of *Bacillus safensis* and *Bacillus siamensis*. 10:670. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040670>

**Asari** S, Matzén S, Petersen M A, Bejai S, Meijer J. (2016). Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. FEMS Microbiol Ecol. 92(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw070>

**Azeem** M, Haider M Z, Javed S, Saleem M H, Alatawi A. (2022). Drought Stress Amelioration in Maize (*Zea mays* L.) by Inoculation of *Bacillus* spp. Strains under Sterile Soil Conditions. Agriculture. 12(1):50. <https://doi.org/10.3390/agriculture12010050>

**Bektas** I. Yazdic F C, Kusek M. (2023). Identification and screening apple endophytic bacteria applied at different times for biological control of *Alternaria* rot on apple in Turkey. PREPRINT. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3446384/v1>

**Brettin** T, Davis J J, Disz T, Edwards R A, Gerdes S, Olsen G J, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch G D, Shukla M, Thomason III J A, Stevens R, Vonstein V, Wattam A R and Xia F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation

of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. Scientific reports. 5:8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>

**Calderón C, D J.** 2024. Cómo cultivar chile serrano en casa: sigue esta sencilla guía para sembrarlo fácilmente. Enseñame de ciencia. <https://ensedeciencia.com/> (Consultado el 08 de junio del 2024).

**Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C and Mahillon J.** (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. Frontier Microbiology. 10:302. <https://doi.org.10.3389/fmicb.2019.00302>

**Chavéz A R y Aquino Jara A S.** (2012). Control of soil fungi *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. and *Sclerotium* sp. with plant extracts. Investigación agraria. [en línea]. 14(1): 17-23.

**Chandrasekaran M, Paramasivan M, Sahayarayan J J.** (2022). Microbial Volatile Organic Compounds: An Alternative for Chemical Fertilizers in Sustainable Agriculture Development. Microorganisms. 11:42. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010042>

**Chebotar V K, Zaplatkin A N, Chizhevskaya E P, Gancheva M S, Voshol G P, Malfanova N V, Baganova M E, Khomyakov Y V, Pishchik V N.** (2023). Phytohormone Production by the Endophyte *Bacillus safensis* TS3 Increases Plant Yield and Alleviates Salt Stress. Plants. 13(1), 75: <https://doi.org/10.3390/plants13010075>

**Chen L, Wu Y D, Chong X Y, Xin Q H, Wang D X and Bian K.** (2019). Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused *Sclerotium rolfsii*. Journal of Applied Microbiology. <https://doi.org/10.1111/jam.14508>

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, approved standard, 12th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018

**Chowdhury S K, Majumdar S, Mandal V. (2020).** Application of *Bacillus* sp. LBF-01 in *Capsicum annuum* plant reduces the fungicide use against *Fusarium oxysporum*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 27. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101714>

**Cruz Vázquez J K, Contreras García, L I, Ávila Serrano, N Y, Bernabé Pineda M, Ruíz Ruíz, F G. (2019).** Evaluación de tres compuestos fenólicos como blancos potenciales en el control de la antracnosis. *Acta Uni. México*. 29. <http://doi.org/10.15174/au.2019.2200>

**Davis J J, Wattam A R, Aziz R K, Brettin T, Butler R, Butler R M, Chlenski P, Conrad N, Dickerman A, Dietrich E M, Gabbard J L, Gerdes S, Guard A, Kenyon R W, Machi D, Mao C, Murphy-olson D, Nguyen M, Nordberg E K, Olsen G J, Olson R D, Overbeek J C, Overbeek R, Parrello B, Pusch G D, Shukla M, Thomas C, VanOeffelen M, Vonstein V, Warren A S, Xia F, Xie D, Yoo H and Stevens R. (2019).** The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Research*. 48:606-612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz943>

**De la Cruz-Quiroz R, Roussos S, Rodríguez-Herrera R, Hernández-Castillo D, Aguilar C N. (2018).** Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala International of Modern Science*. 4(2): 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.03.002>

**Dewi E, Rosmana A and Kuswinanti T. (2021).** The use of endophyte fungal isolates in controlling *Fusarium oxysporum*, the causal agent of wilt disease on chilli (*Capsicum annuum*), *Earth and Environmental Science*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022104>

- Dowarah B**, Agarwal H, Krishnatreya D B, Sharman P L, Kalita N and Agarwala N. (2021). Evaluation of seed associated endophytic bacteria from tolerant chilli cv. Firingi Jolokia for their biocontrol potential against bacterial wilt disease. *Microbiological Research*. 248, 126751. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126751>
- Dong X**, Fang L, Ye Z, Zhu G, Lai Q, Liu S. (2021). Screening of biocontrol bacteria against soft rot disease of *Colocasia esculenta* (L.) schott and its field application. *PLoS ONE*. 16:(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254070>
- Dwivedi S K** and Prasad G. (2016). Integrated Management of *Sclerotium Rolfsii*: an overview. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 3(11):137-146. <https://www.researchgate.net/publication/326519037>
- Edgar C E**. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5):1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fiedler G**, Schneider C, Igbinosa E O, Kabisch J, Brinks E, Becker B, Stoll D A, Cho G-S, Huch Melanie, Franz C M A P. (2019). Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC Microbiol*. 19:250. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1632-2>
- Fira D**, Dimkić I, Berić T, Lozo J and Stanković S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Gao H**, Li P, Xu X, Zeng Q, Guan W. (2018). Research on Volatile Organic Compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol Effects on Fruit Fungal Pathogens and Dynamic Changes During Fermentation. *Front. Microbiol*. 9:456. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00456>
- Grahovac J**, Pajčin I, Vlajkov V. (2023). *Bacillus* VOCs in the Context of Biological Control. *Antibiotics*. 12, 581. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030581>

**González** Espinosa J, Hernández Gómez Y F, Javier Martínez Y, Flores Gallardo F J, Pacheco Aguilar J R, Ramos López M Á, Arvina Gómez J L, Saldaña Gutierrez C, Rodríguez Morales J A, García Gutiérrez M C, Amaro Reyes A, Álvarez Hidalgo E, Nuñez Ramírez J, Hernández Flores J L, Campos Guillén J. (2023). *Kosakonia cowanii* Ch1 Isolated from Mexican Chili Powder Reveals Growth Inhibition of Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*. 11.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071758>

**Han** Y, Li X, Sun W, Zhang Q. (2017). Co-production of Multiple Antimicrobial Compounds by *Bacillus amyloliquefaciens* WY047, a Strain with Broad-Spectrum Activity. 24:160-171. <https://doi.org/10.1007/s12209-017-0097-3>

**Hernández Castillo** F D, Flores Flores W, Castillo Reyes F, Gallegos Morales G, Castro Del Ángel E. (2014). Antibiosis *In vitro* of *Trichoderma* Strains Metabolic Extracto n Mycelial Growth and Reproductive Capacity of *Fusarium Oxysporum* Isolated from Pepper Plants (*Capsicum annuum* L.). *British Biotechnology Journal*. 4(4): 387-399. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2014/7341>

**Hernández Flores** J L, Martínez Y J, Ramos López M A, Saldaña Gutierrez C, Reyes A A, Armendariz Rosales M M, Cortés Pérez M J, Mendoza M F, Ramírez Ramírez J, Ramírez Zavala G, Tovar Becerra P L, Valdez Santoyo L, Villasana Rodríguez K, Rodríguez Morales J A, Campos Guillén J. (2023). Volatile Organic Compounds Produced by *Kosakonia cowanii* Cp1 Isolated from the Seeds of *Capsicum pubescens* R & P Possess Antifungal Activity. *Microorganisms*. 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102491>

**Jiao** R, Cai Y, He P, Munir S, Li X, Wu Y, Wang J, Xia M, He P, Wang G, Yang H, Karunarathna S C, Xie Y and He Y. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* YN201732 Produces Lipopeptides with Promising Biocontrol Activity Againts Fungal Pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*. 11:598999. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.598999>

- Jiménez-Pérez** O, Gallegos-Morales G, Sánchez-Yañez J M, Dávila-Medina M D, Castillo-Reyes F. (2022). Perspectivas del control biológico de fitopatógenos asociados a la secadera del cultivo de chile. 171-189. <https://www.researchgate.net/publication/362465948>
- Kammar** S C, Swamy M, Naik N M, Gundappagol R C, Desai B K, S A Y. (2021). *In vitro* Biocontrol Efficiency of Bacterial Endophytes and its Effect on Growth Parameter of Chilli (*Capsicum annuum* L.). Biological Forum – An International Journal. 76-80. <https://www.researchgate.net/publication/357173363>
- Kaspar** F, Neubauer P and Gimpel M. (2019). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. Journal of Natural Products. 82(7):2038-2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Kazerooni** E A, Maharachchikumbura S N, Al-Sadi A M, Kang S-M, Yun B-W, Lee I-J. (2021). Biocontrol Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Botrytis pelargonii* and *Alternaria alternata* on *Capsicum annuum*. Journal of fungi. 7:472. <https://doi.org/10.3390/jof7060472>
- Khalaf** E M and Raizada M N. (2016). Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. BMC Microbiology. 16:131. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0743-2>
- Khalaf** E M and Raizada M N. (2018). Bacterial Seed Endophytes of Domesticated Cucurbits Antagonize Fungal and Oomycete Pathogens Including Powdery Mildew. Frontiers in Microbiology. 9:42. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>
- Khalil** M I I, Youssef S A, Tartoura K A and Eldesoky A A, (2021). Comparative evaluation of physiological and biochemical alteration in tomato plants infected by *Alternaria alternata* in response to *Trichoderma viride* and *Chaetomium globosum* application. Physiological and Molecular Plant Pathology. 115, 101671. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101671>

**Kiesewalter** H T, Lozano-Andrade C N, Wibowo M, Strube M L, Maróti G, Snyder D, Jørgensen T S, Larsen T O, Cooper V S, Weber T and Kovács A T. (2021). Genomic and Chemical Diversity of *Bacillus subtilis* Secondary Metabolites against Plant Pathogenic Fungi. *Microbial Ecology*. 6(1). doi: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00770-20>

**Kim** J A, Song J-S, Kim P, Kim D-H, Kim Y. (2022). *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a Promising Agent for Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi. 8: 1053. <https://doi.org/10.3390/jof8101053>

**Köhl** J, Kolnaar R and Ravensberg W J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*. 10:845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>

**Krzywinski** M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones S J and Marra M A. (2012) Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*. 19:1639-1645. <https://doi.org/10.1101/gr.092759.109>

**Kumari** P, Bishnoi S K, Chandra S. (2021). Assessment of antibiosis potential of *Bacillus* sp. against the soil-borne fungal pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough).

**Kumar** V, Dubedi Anal A K, Rai S, Nath V. (2017). Leaf, panicle and fruit blight of litchi (*Litchi chinensis*) caused by *Alternaria alternate* in Bihar state, India. *Can. J. Plant Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1080/07060661.2017.1401005>

**Marzouk** T, Chaouachi M, Sharma A, Jallouli S, Mhamdi R, Kaushik N, Djébal N. (2021). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* using volatile organic compounds of solanaceae seed-borne endophytic bacteria. *Postharvest Biology and Technology*.181. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111655>

**Miguel-Ferrer** L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P. (2021). Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium*

*solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. Mexican Journal of Phytopathology. 39(2): 228-247. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-5>

**Moshe M**, Gupta CL, Jain RM, Sela N, Minz D, Banin E, Frenkel O, Cytryn E. (2023). Comparative genomics of *Bacillus cereus sensu lato* spp. biocontrol strains in correlation to *in-vitro* phenotypes and plant pathogen antagonistic capacity. *Front. Microbiol.* 14:996287. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.996287>

**Narayanasamy S**, Thankappan S, Kumaravel S, Ragupathi and Uthandi S. (2023). Complete genome sequence analysis of a plant growth-promoting phylloplane *Bacillus altitudinis* FD48 offers mechanistic insights into priming drought stress tolerance in rice. *GENOMICS.* 115(1). <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110550>

**Negi R**, Kaur T, Devi R, Kour D, Yadav A N. (2023). Assessment of nitrogen-fixing endophytic and mineral solubilizing rhizospheric bacteria as multifunctional microbial consortium for growth promotion of wheat and wild relative *Aegilops kotschyi*. *Helyon.* 8(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12579>

**Ntushelo K**, Ledwaba L K, Rauwane M E, Adebo O A, Njobeh P B. (2019). The Mode of Action of *Bacillus* Species against *Fusarium graminearum*, Tools for Investigation and Future Prospects. *Toxins.* 11(10): 606. doi:10.3390/toxins11100606

**Olson R D**, Assaf R, Brettin T, Conrad N, Cucinell C, Davis J J, Kuscuoglu M, Lefkowitz E J, Lu J, Machi D, Macken C, Mao C, Niewiadomska A, Nguyen M, Olsen G J, Overbeek J C, Parrello B, Parrello V, Porter J S, Pusch G D, Shukla M, Singh I, Stewart , Tan G, Thomas C, VanOeffelen M, Vonstein V, Wallace Z S, Warren A S, Wattam A R, Xia F, Yoo H, Zhang Y, Zmasek C M, Scheuermann R H and Stevens R L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research.* 51:678-689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>

**Ondov B D**, Treangen T J, Melsted P, Mallonee A B, Bergman N H, Koren S and Phillippy A M. (2016). Mash: fast genome and metagenome distance estimation

using MinHash. Genome Biology. 17:132. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-X>

**Pal G**, Kumar K, Verma A and Kumar Verma S. (2022). Seed inhabiting bacterial endophytes of maize promote seedling establishment and provide protection against fungal disease. Microbiological Research. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126926>

**Pandey K D**, Patel A K, Singh M and Kumari A. (2021). Secondary metabolites from bacteria and viruses. Laboratory of Environmental Microbiology. Natural Bioactive Compounds: Technological Advancements. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820655-3.00002-1>

**Park K M**, Jeong M, Park K J and Koo M (2018). Prevalence, Enterotoxin Genes, and Antibiotic Resistance of *Bacillus cereus* Isolated from Raw Vegetables in Korea. Journal of Food Protection. 81(10):1590-1597. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-205

**Pedraza L A**, Lopéz C E y Uribe-Vélez D. (2019). Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. Acta biológica colombiana. 25(1):112-125. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

**Perales-Segovia C**, De la Torre-Pizaña M A, Valera-Montero L L, Espinoza-Sánchez E A, Sanjuan-Lara F, Silos-Espino H. (2018). Prevalencia del engrosamiento del cladodio del nopal en el centro norte de México. Rev. Bio ciencias. 5: 1-9. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.05.2018.03>

**Prakash J**, Arora N K. (2021). Novel metabolites from *Bacillus safensis* and their antifungal property against *Alternaria alternata*. Antoine van Leeuwenhoek. 114: 1245-1258. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01598-4>

**Roca-Couso R**, Flores-Félix J D and Rivas R. (2021). Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea*. Journal of Fungi. 7:1045. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>

**Rojo-Baéz** I, Álvarez-Rodríguez B, García-Estrada R S, León-Félix J, Sañudo-Barajas A, Allende-Molar R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. Rev. Mex. Fitopatol. 35(3): 549-570. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>

**Ruangwong** O-U, Pornsuriya C, Pitija K, Sunpapao A. (2021). Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma koningiopsis* PSU3-2 against Postharvest Anthracnose of Chili Pepper. Journal of Fungi. 7:276. <https://doi.org/10.3390/jof7040276>

**Samreen** T, Naveed M, Nazir M Z, Asghar H N, Khan M I, Zahir Z A, Kanwal S, Jeevan B, Sharma D, Meena V S, Meena S K, Sarkar D, Devika O S, Parihar M and Choudhary M. (2021). Seed associated bacterial and fungal endophytes: Diversity, life cycle, transmission, and application potential. Applied Soil Ecology. 168:104191. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104191>

**Sánchez-García** B M, Ramírez-Pimentel J G, Guevara-Acevedo L P, Raya-Pérez J C, Covarrubias-Prieto J and Mora-Avilés M A. (2019). Actinobacteria with antagonistic potential *in vitro* to phytopathogenic fungi and promotion of growth in chili plants. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 23. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i23.2033>

**Sharma** A., Kaushik N, Sharma A, Bajaj A, Rasane M, Shouche Y S, Marzouk T, Djéballi N. (2021). Screening of Tomato Seed Bacterial Endophytes for Antifungal Activity Reveals Lipopeptide Producing *Bacillus siamensis* Strain NKIT9 as a Potential Bio-Control Agent. Front. Microbiol. 12:609482. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.609482>

**SIAP**, 2023. <https://agroproductores.com/los-principales-cultivos-de-mexico/>. (Consultado 28 de abril del 2023).

**Shuckla** V, Kumar S, Tripathi Y N, Upadhyay R S. (2022). *Bacillus subtilis*- and *Pseudomonas fluorescens*-Mediated Systemic Resistance in Tomato Against *Sclerotium rolfsii* and Study of Physio-Chemical Alterations. Front. Fungal Biol. 3. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.851002>

**Song** J, Ling L, Xu X, Jiang M, Guo L, Pang Q, Xiang W, Zhao J, W X. (2023). Biological control of gray mold of tomato by *Bacillus altitudinis* B1-15. Biol Control. 183. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105247>.

**Srikhong** P, Lertmongkonthum K, Sowanpreecha R, Rerngsamran P. (2018). *Bacillus* sp. strain M10 as a potential biocontrol agent protecting chili pepper and tomato fruits from anthracnose disease caused by *Colletotrichum capsici*. Biocontrol. 63: 833-842. <https://doi.org/10.1007/s10526-018-9902-8>

**Stamatakis** A, (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and Post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics applications note. 30(9):1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

**Stamatakis** A, Hoover P and Rougemont J. (2008). A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web Servers. Society of Sistematic Biologist. 57(5):758-771. <https://doi.or/10.1080/10635150802429642>

**Tejera-Hernández** B, Rojas-Badía M M and Heydrich-Pérez M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42(3):131-138. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>

**Valenzuela Ruiz** V, Gálvez Gamboa G T, Villa Rodríguez E D, Parra Cota F I, Santoyo G y de los Santos-Villalobos S. (2020). Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. Revisa Mexicana de Ciencias Agrícolas. 11(2):419-432. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191>

**Vater** J, Tam, L T T, Jähne J, Herfort S, Blumenscheit C, Schneider A, Luong P T, Thao L T P, Blom J, Klee S R, Schweder T, Lasch P, Borriss R. (2023). Plant-Associated Representatives of the *Bacillus cereus* Group are a Rich Source of Antimicrobial Compounds. Microorganisms. 11, 2677. <https://doi.org/10.20944/preprints202310.0635.v2>

**Wei J, Zhao J, Suo M, Wu H, Zhao M and Yang H.** (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus velezensis* against *Fusarium oxysporum* from *Panax ginseng*. Biological Control. 182,105222. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105222>

**Wu Z, Huang Y, Li Y, Dong J, Liu X, Li C** (2019). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* via Induction of the Defense Mechanism and Antimicrobial Compounds Produces by *Bacillus subtilis* SL-440 on Pepper (*Capsicum annuum* L.). Frontier Microbiology. 10:2676. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02676>

**Xie S, Liu J, Gu S, Chen X, Jiang H, Ding T.** (2020). Antifungal activity of volatile compounds produces by endophytic *Bacillus subtilis* DZSY21 against *Curvularia lunata*. Annals of Microbiology. 70:2. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01553-0>

**Yang F, Zhang R, Wu X, Xu T, Ahmad S, Zhang X, Zhao J and Liu Y.** (2020). An endophytic strain of the genus *Bacillus* isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L.) has antagonistic activity against maize pathogenic strains. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104074>

**Zhang D, Qiang R, Zhao J, Zhang J, Cheng J, Zhao D, Fan Y, Yan Z and Zhu J.** (2022). Mechanism of a Volatile Organic Compound (6-Methyl-2-Heptanone) Emitted From *Bacillus subtilis* ZD01 Againsts *Alternaria solani* in Potato. Frontiers in Microbiology. 12:808337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.808337>

**Zubieta-Coronado D A, ECHEVERRY-PRIETO L A, ZAFRA-MEJIA C A.** (2021). Antagonismo in vitro por consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra el fitopatógeno *Sclerotinia* sp. Rev. Bio. Agro. 19(1): 16-31. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(19\)16-31](https://doi.org/10.18684/bsaa(19)16-31)