



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Regulación de la expresión genética de *Kosakonia cowanii* Ch1 durante la competencia contra *Sclerotium rolfsii*

Tesis

Que como parte de los requisitos para  
obtener el Grado de Maestría en Ciencia y  
Tecnología Ambiental

Presenta

Lic. en Biol. Jacqueline González Espinosa

Dirigido por

Dr. Juan Campos Guillén

Santiago de Querétaro, Qro, 2025

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

Regulación de la expresión genética de *Kosakonia cowanii* Ch1 durante la competencia contra *Sclerotium rolfsii*

Tesis

Que como parte de los requisitos para  
obtener el Grado de Maestría en Ciencia y  
Tecnología Ambiental

Presenta

Lic. en Biol. Jacqueline González Espinosa

Dr. Juan Campos Guillén  
Presidente

Dr. Miguel Angel Ramos López  
Secretario

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez  
Vocal

Dr. Víctor Pérez Moreno  
Suplente

Dr. José Alberto Rodríguez Morales  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Agosto, 2025  
México

## **Dedicatorias**

A mis padres. A mi mamá, porque sin ti no sería lo que soy. Porque gracias a tu amor, tu fuerza y tu ejemplo llegué tan lejos. Tú me inspiraste a ser una mujer de ciencia, y con tu apoyo constante logré cumplir este sueño.

A mi papá, que desde el cielo sé que estaría orgulloso de mí. Gracias por enseñarme a no rendirme y por mostrarme que la vida se mira mejor con curiosidad y amor.

A mis abuelitos, que también estarían felices de verme llegar hasta aquí. En especial a mi abuelita paterna, que me ha cuidado con ternura y me ha sostenido con cariño incondicional

A mis amigas y amigos, por cada conversación, cada lágrima compartida, cada palabra de ánimo en los momentos más duros. Gracias por estar, por creer en mí, y por sostenerme con su amistad firme y luminosa.

A la persona que nunca dejó de creer en mí. A quien celebró cada pequeño logro como si fuera el más grande, y que, aún sin conocer a fondo mi mundo, se impresionaba con mis pasos. Gracias por tomarme de la mano cada vez que sentí que no podía más. Contigo, bastaba.

A Max, mi compañero de vida. Diez años juntos, y cada uno de ellos ha sido un regalo. Gracias por acompañarme en tantas noches de desvelo, por ser el consuelo silencioso, el abrazo peludo, la constancia dulce que toda científica necesita. Eres lo mejor que me ha pasado.

A Dios, gracias por poner en mi camino a cada una de estas personas, y por darme la vida suficiente para seguir soñando, construyendo y avanzando.

Y a mí. Por no detenerme, aun cuando el mar era incierto. Por seguir, incluso con la marea en contra. Este logro se formó con aguas que me guiaron y de la calma que aprendí a encontrar en medio del oleaje.

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de muchas personas e instituciones. Quiero expresar un profundo agradecimiento:

A mi director de tesis, Dr. Juan Campos Guillén, por su gran orientación durante todo este largo camino. Gracias por enseñarme, guiarme y confiar en mí, y porque sé que fue un aprendizaje mutuo: un biólogo nunca deja de aprender ni de maravillarse.

A mis maestros de posgrado, gracias por su acompañamiento y por inspirarme a seguir creciendo. A mis compañeros, por las risas, los desvelos y los aprendizajes compartidos; su presencia hizo de esta etapa algo único.

A los integrantes de mi laboratorio, por acompañarme con entusiasmo en cada experimento. Gracias por su habilidad y disposición para que tantos procedimientos fueran posibles.

A mis padres, Silvia y Edgardo, por haberme dado el mejor regalo: la oportunidad de estudiar. Esta carrera es el fruto de su amor, esfuerzo y confianza en mí. Gracias por ser mi raíz y mi impulso.

A quienes estuvieron a mi lado cuando más lo necesité, compartiendo mis dudas y alegrías. A mis amistades entrañables y a mi pareja, por su amor, paciencia y por caminar conmigo incluso en los días más inciertos. Este logro también es suyo. Y a ti, mi mejor amiga, mi compañera incansable, que hiciste más llevadero este trayecto y supiste recordarme, aún en el caos, que valía la pena seguir.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, que me formó con calidez y compromiso. Y al CONACYT, por la beca otorgada que me permitió dedicarme de lleno a este proyecto.

Gracias a todas y todos. Mi gratitud vive en cada palabra, en cada paso y en cada logro.

## Índice General

Índice de Cuadros.....	VIII
Índice de Figuras .....	IX
Resumen .....	X
Abstract.....	XI
1.Introducción .....	13
2. Antecedentes .....	15
2.1 Uso de agroquímicos y sus problemas asociados .....	15
2.2 Control de hongos fitopatógenos.....	16
2.3 Enfermedades causadas por hongos fitopatógenos .....	16
2.4 <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	17
2.4.1 Generalidades .....	17
2.4.2 Taxonomía .....	18
2.4.3 Descripción morfológica.....	18
2.4.4 Desarrollo de la enfermedad y síntomas .....	20
2.4.5 Control químico de <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	20
2.5 Alternativas de Control Biológico.....	21
2.6 Compuestos orgánicos volátiles microbianos .....	22
2.7 Funciones de los COV's bacterianos en las interacciones microbianas .....	23
2.7.1 COV's bacterianos como antagonistas de hongos .....	23
2.7.2 Mecanismo antifúngico de los COV's.....	25
2.7.3 Influencia de los COV's bacterianos en colonias bacterianas .....	28
2.8 <i>Kosakonia cowanii</i> .....	30
2.8.1 Características.....	30
2.8.2 Distribución de la especie .....	31
2.8.3 Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por <i>Kosakonia cowanii</i> mediante la producción de COV's.....	31
3. Hipótesis .....	33
4. Objetivos .....	34

4.1	Objetivo general.....	34
4.2	Objetivos específicos .....	34
5.	Metodología .....	35
5.1	Sitio de estudio .....	35
5.2	Condiciones de crecimiento de <i>Kosakonia cowanii</i> Ch1 .....	35
5.3	Material fúngico .....	35
5.4	Prueba in vitro de la interacción de los COV's con <i>Kosakonia cowanii</i> Ch1 y <i>Sclerotium rolfii</i> .....	35
5.5	Análisis transcriptómicos .....	38
5.5.1.	Extracción de RNA .....	38
5.5.2	Preparación de bibliotecas para ARN-Seq .....	38
5.5.3	Análisis Bioinformático .....	39
5.5.4	Genes de interés y Análisis de enriquecimiento de vías .....	40
5.6	Diseño experimental y Análisis estadístico.....	41
6.	Resultados .....	42
6.1	Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) y <i>Kosakonia cowanii</i> Ch1 en el crecimiento de <i>Sclerotium rolfii</i> .....	42
6.2.	Análisis del transcriptoma de <i>Kosakonia cowanii</i> Ch1 durante la interacción con COV's y <i>Sclerotium rolfii</i> .....	43
6.2.1	Extracción de RNA.....	43
6.2.2	Integridad y concentración de RNA .....	44
6.2.3	Estadísticas generales de los datos de RNA-seq. ....	46
6.2.4	Evaluación de calidad de secuencias.....	47
6.2.5	Alineamiento y mapeo de lecturas .....	49
6.2.6	Distribución de lecturas y clasificación de tipos de ARN.....	50
6.2.7	Distancia y similitud entre muestras .....	52
6.3	Expresión genética diferencial .....	53
6.3.1	Genes expresados diferencialmente en <i>K. cowanii</i> Ch1 en presencia de <i>S. rolfii</i> .....	54
6.3.2	Genes expresados diferencialmente en <i>K. cowanii</i> Ch1 en presencia de <i>S. rolfii</i> y COV's .....	59

7. Discusión .....	62
8. Conclusiones .....	79
9. Referencias bibliográficas .....	80
10. Anexos .....	93



## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Sclerotium rolfii</i> (NCBI, 2021).....	18
<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos en la sinergia de <i>K. cowanii</i> Ch1 y los COV's para inhibir a <i>S. rolfii</i> .....	37
<b>Cuadro 3.</b> Parámetros de concentración, pureza e integridad del ARN en <i>K. cowanii</i> en los distintos tratamientos.....	44
<b>Cuadro 4.</b> Estadísticas generales de las lecturas de RNA-seq para los distintos tratamientos.....	47

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Características morfológicas de <i>Sclerotium rolfii</i> (Irazoqui, 2021).....	19
<b>Figura 2.</b> Infección por <i>S. rolfii</i> en la parte inferior del tallo de una berenjena, provocando el colapso total de la planta (Langston, 2023). .....	20
<b>Figura 3.</b> Efecto de los COV's microbianos en hongos fitopatógenos. (Modificado de Almeida, <i>et al.</i> , 2023).....	26
<b>Figura 4.</b> Respuestas en bacterias causadas por COV's producidos por bacterias (Modificado de Schulz-Bohm <i>et al.</i> , 2017).....	28
<b>Figura 5.</b> Representación del método de placas intercaladas para <i>K. cowanii</i> Ch1, COV's y <i>S. rolfii</i> (Modificado de Ninoska <i>et al.</i> , 2021).....	36
<b>Figura 6.</b> Ensayos de interacción microbiana.....	43
<b>Figura 7.</b> Perfil de integridad del ARN en muestras de <i>K. cowanii</i> Ch1 bajo diferentes condiciones experimentales.....	46
<b>Figura 8.</b> Calidad promedio de las lecturas de RNA-Seq, evaluada mediante FastQC.....	48
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de alineamiento de lecturas en los distintos tratamientos.....	49
<b>Figura 10.</b> Distribución de las lecturas en las distintas regiones del genoma.....	50
<b>Figura 11.</b> Distribución de los biotipos de ARN en las muestras analizadas.....	51
<b>Figura 12.</b> Matriz de similitud de muestras basada en la correlación de Pearson.....	52
<b>Figura 13.</b> Visualización tipo MA de la expresión génica diferencial en <i>K. cowanii</i> Ch1.....	53
<b>Figura 14.</b> Enriquecimiento de ontología génica (GO) en <i>K. cowanii</i> Ch1 durante la interacción con <i>S. rolfii</i> .....	58
<b>Figura 15.</b> Enriquecimiento de ontología génica (GO) en <i>K. cowanii</i> Ch1 durante la interacción con <i>S. rolfii</i> en presencia de COV's.....	61

## Resumen

La agricultura es esencial para cualquier país, por lo que la búsqueda de métodos sostenibles y seguros se ha vuelto una prioridad. El uso excesivo de agroquímicos ha generado preocupación por sus efectos adversos sobre la salud y el ambiente, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas como el control biológico mediante compuestos naturales. Entre ellos destacan los compuestos orgánicos volátiles (COV's) microbianos, pequeñas moléculas con diversa composición química, capaces de alterar la morfología celular y modular la expresión genética, afectando así el metabolismo de los organismos expuestos. *Kosakonia cowanii* Ch1 ha demostrado una notable capacidad para inhibir al hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* mediante COV's. En este estudio, se exploró si estos compuestos, además de su efecto antifúngico, pueden también modificar la expresión genética de la propia bacteria durante su interacción de competencia. Los ensayos *in vitro* revelaron una inhibición micelial de hasta el 100 % en condiciones específicas. Posteriormente, se realizó un análisis transcriptómico bajo condiciones de competencia con y sin la presencia de COV's. Los resultados mostraron una sobreexpresión de genes relacionados con captación de hierro, respuesta al estrés oxidativo, motilidad bacteriana y biosíntesis de metabolitos secundarios, así como la represión de rutas metabólicas centrales. Estos hallazgos sugieren que los COV's actúan no solo como inhibidores del hongo, sino también como señales intracelulares que modulan la fisiología bacteriana, favoreciendo su éxito competitivo. Este estudio aporta evidencia sobre el papel dual de los COV's en interacciones microbianas y refuerza su potencial para el desarrollo de estrategias de biocontrol más eficientes y sostenibles.

**Palabras clave:** *Kosakonia cowanii*, *Sclerotium rolfsii*, COV's, inhibición, expresión genética

## **Abstract**

Agriculture plays a crucial role in any country, making the search for sustainable and safe alternatives increasingly important. The excessive use of agrochemicals has raised serious concerns due to their harmful impacts on human health and the environment, fostering interest in biological control strategies based on natural compounds. Among these, microbial volatile organic compounds (VOCs) stand out as small molecules with diverse chemical structures capable of altering cell morphology and modulating gene expression, thus affecting the metabolism of exposed organisms. *Kosakonia cowanii* Ch1 has shown strong potential to inhibit the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii* through VOC release. This study evaluated whether, beyond their antifungal effect, these compounds can also influence gene expression in *K. cowanii* Ch1 during competitive interactions. In vitro assays demonstrated up to 100% mycelial inhibition under specific conditions. Subsequently, a transcriptomic analysis was performed under competitive conditions, both with and without VOC exposure. The results revealed the upregulation of genes involved in iron uptake, oxidative stress response, bacterial motility, and secondary metabolite biosynthesis, alongside the repression of central metabolic pathways. These findings suggest that VOCs act not only as fungal inhibitors but also as intracellular signals that modulate bacterial physiology and enhance competitive fitness. This research underscores the dual role of VOCs in microbial interactions and highlights their potential for the development of more effective and sustainable biocontrol strategies.

**Keywords:** *Kosakonia cowanii*, *Sclerotium rolfsii*, VOCs, inhibition, gene expression

**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 declaro y doy reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, reading "González" on the top line and "Jacqueline." on the bottom line. The script is cursive and fluid.

Jacqueline González Espinosa

## 1. Introducción

La agricultura es una de las actividades fundamentales para asegurar el desarrollo sostenible de las naciones y la seguridad alimentaria global. En los últimos años, se ha observado un crecimiento constante en la demanda de productos agrícolas, lo que ha impulsado el uso de técnicas destinadas a optimizar los rendimientos, como fertilizantes, agroquímicos y sistemas de riego. Sin embargo, este progreso también ha traído consigo nuevas preguntas sobre los costos ecológicos y sociales de dichas prácticas.

Entre los principales desafíos que enfrenta la agricultura están las enfermedades causadas por fitopatógenos, responsables de pérdidas de hasta un 40 % en la productividad agrícola mundial, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Aunque los agroquímicos son la herramienta principal para combatir estos problemas, su uso inadecuado puede derivar en riesgos para la salud humana, contaminación ambiental y la aparición de patógenos resistentes. Ante este panorama, ha cobrado fuerza el interés por estrategias alternativas que promuevan un manejo más respetuoso con el ambiente, como el control biológico.

Este se basa en el uso de organismos vivos o de sus productos para limitar el crecimiento de plagas y enfermedades. En el caso de los fitopatógenos, existen múltiples formulaciones comerciales que aprovechan microorganismos benéficos o sus derivados, incluyendo metabolitos secundarios, productos enzimáticos o preparaciones celulares. Dentro de este campo emergente, los compuestos orgánicos volátiles (COV's) producidos por bacterias y hongos han despertado especial interés por su capacidad para actuar como señales químicas, capaces de influir en procesos tan complejos como la morfología, el metabolismo y la expresión génica de otros organismos.

Estudios recientes han demostrado que la cepa *Kosakonia cowanii* Ch1 presenta una notable actividad antifúngica mediada por la producción de COV's, entre los

que se han identificado compuestos como ácido dodecanoico, 3-hidroxietanol, 2,5-dimetilpirazina, entre otros. Si bien se ha evidenciado su efecto inhibitorio sobre hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, aún se desconoce si estos compuestos también ejercen un efecto autorregulador sobre la fisiología de *K. cowanii* Ch1.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar la regulación de la expresión genética en *K. cowanii* Ch1 durante su interacción de competencia con *S. rolfsii*, tanto en presencia como en ausencia de sus propios COV's. A través de ensayos in vitro y análisis transcriptómico, este estudio busca aportar evidencia sobre los mecanismos moleculares involucrados en la competencia microbiana y profundizar en el potencial de los COV's como herramientas biotecnológicas para el desarrollo de estrategias de biocontrol más eficientes, sostenibles y respetuosas con el ambiente.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Uso de agroquímicos y sus problemas asociados**

Los plaguicidas son sustancias químicas de naturaleza compleja y juegan un papel esencial en la solución de los problemas comunes que afectan a los cultivos agrícolas. A pesar de sus beneficios químicos, su uso indebido puede acarrear una serie de riesgos que superan sus ventajas (Ramírez-Campos, 2020).

Los agroquímicos son productos empleados en la agricultura que pueden presentar un alto grado de toxicidad y traen consigo efectos perjudiciales en diversos aspectos. Estos compuestos, al ser aplicados de forma continua y en exceso a los cultivos, pueden causar un impacto en el ecosistema. Experimentan una serie de cambios tras su aplicación en el campo, lo que resulta en que aproximadamente el 98 % de los insecticidas y el 95 % de los herbicidas utilizados no logran su objetivo de llegar a la planta y se dispersan a través del viento y el agua. Los componentes tóxicos tienen la capacidad de desplazarse a largas distancias, convirtiéndose en residuos volátiles que son transportados a la atmósfera y retornan a nuevas áreas. Por ejemplo, pueden movilizarse a través del agua de riego para contaminar fuentes de agua limpia, tanto subterráneas como superficiales (ríos, lagos y mares). Además, pueden desplazarse con la lluvia o a través del suelo (escorrentía, lixiviación o lavado) (López *et al.*, 1992).

Sin embargo, existe una falta de conocimiento acerca de la cantidad y diversidad de sustancias utilizadas en los campos, así como una limitada supervisión de los residuos que con frecuencia se exponen a las influencias ambientales y, en ocasiones, se vuelven a reutilizar. Además, se observa un aumento en las dosis que se aplican por encima de los niveles permitidos (2 a 3 veces más), la combinación de productos para potenciar su eficacia y la elección inadecuada de sustancias para el control de plagas y enfermedades (García-Gutiérrez & Rodríguez-Meza, 2012).

Los efectos ecológicos de los plaguicidas se encuentran por encima de los métodos



convencionales de control fitosanitario, por lo que puede ser uno de los factores más destructivos, además de causar resistencia genética en patógenos y problemas de salud pública (Ramírez-Campos, 2020).

## **2.2 Control de hongos fitopatógenos**

Según Cabrera *et al.*, (2019) en el caso de hongos fitopatógenos, el control químico para el uso de fungicidas es el principal método para el control de las enfermedades provocadas por estos organismos. En su mayoría, los cultivos se protegen con aplicaciones de sulfato de cobre y azufre, sin embargo, el uso de principios activos ha incrementado de manera exponencial, donde se destacan los ftalimidas o los ditiocarbamatos, destacados por tener múltiples sitios de acción.

De igual manera que otros agroquímicos, la aplicación de fungicidas provoca que estos productos se acumulen en alimentos, suelos y aguas, ocurriendo con mayor frecuencia. Por otro lado, los fungicidas provocan una baja en las poblaciones de microorganismos antagónicos naturales presentes en los suelos, lo que ocasiona cambios en la diversidad microbiana y permiten que los organismos patógenos que afectan a los cultivos aumenten su persistencia (Laatikainen & Heinonen, 2002). Esta situación ha causado que hongos del género *Phytm*, *Sclerotium*, *Fusarium* *Botrytis* y la especie *Rhizoctonia solani* hayan aumentado su persistencia en los últimos años. Debido a esto se debe realizar una búsqueda de nuevas estrategias sustentables que permitan controlar las plagas y enfermedades (Lucas *et al.*, 2015).

## **2.3 Enfermedades causadas por hongos fitopatógenos**

Los hongos que afectan a las plantas, conocidos como hongos fitopatógenos, ejercen un gran impacto al destruir aproximadamente un tercio de las cosechas anuales. En particular, provocan pérdidas en cinco alimentos cruciales a nivel mundial: arroz, trigo, maíz, papa y soya, los cuales son de suma importancia. Entre los géneros de hongos que atacan estos cultivos se incluyen *Fusarium*, *Giberella*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Alternaria* y *Botrytis*, entre muchos otros (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2023).

Los hongos fitopatógenos son organismos generalmente microscópicos, que se reproducen principalmente mediante la generación de esporas. La mayoría de ellos desarrollan una estructura vegetativa filamentosa conocida como micelio, responsable de su apariencia similar al algodón. Esta característica se emplea en la agricultura para distinguir enfermedades originadas por los hongos o por bacterias. Los hongos pueden subsistir durante distintos ciclos agrícolas en diversas formas, como: micelio, esclerocios (masas densas de hifas), clamidosporas (esporas resistentes) y esporas presentes en tejidos infectados, hojas y frutos caídos, además de encontrarse en el suelo o sobre semillas y material vegetativo (Lastres & Soza, 2009).

Las enfermedades causadas por hongos no surgen de manera repentina, sino que tienen un origen en diversas fuentes, como hospederos alternativos, material infectado en descomposición, esporas latentes presentes en el suelo, entre otros (Lastres & Soza, 2009). Además, los hongos fitopatógenos tienen la capacidad de generar compuestos como parte de su proceso metabólico secundario, como las micotoxinas, las cuales se dispersan fácilmente en el entorno. Aunque presentes en cantidades mínimas, estas sustancias pueden resultar dañinas. Esta situación amenaza la seguridad de los cultivos a nivel global, representando un alto riesgo para la salud asociado a la inocuidad de los alimentos (FAO, 2001). La contaminación pre y postcosecha ocasionada por hongos toxigénicos y por la acumulación de micotoxinas, sigue siendo un reto para la agricultura a nivel mundial. Esto debido a que los hongos y bacterias fitopatógenos son causantes de diversas enfermedades que conducen a la pérdida de 20-40 % de la cosecha o postcosecha. (Hassan *et al.*, 2021).

## **2.4 *Sclerotium rolfsii***

### **2.4.1 Generalidades**

*Sclerotium rolfsii* es un hongo fitopatógeno que habita en el suelo y cuenta con una gran diversidad de hospederos de alrededor de 500 especies de plantas, causando podredumbres en el cuello y las raíces. La enfermedad que llega a producir

adquiere diferentes denominaciones según literatura, entre ellas: pudrición basal de tallo y raíz, añublo sureño o tizón sureño, mal de esclerocio entre otros. Los cultivos que suelen verse más perjudicados por este patógeno son: judía, manzano, frijol, jitomate, girasol, remolacha, fresa, entre otros (Punja, 1985; González, 2013). *S. rolfsii* tiene una estructura de micelio blanco algodonoso, suele ser de crecimiento rápido y alcanza la formación de sus estructuras de resistencia llamadas esclerocios en pocos días (Punja, 1985). Los esclerocios son de color blanco y van cambiando a un color castaño conforme pasa el tiempo (González, 2013). Se producen en grandes cantidades y pueden sobrevivir a las condiciones adversas durante cinco años en el suelo (Punja, 1985).

#### 2.4.2 Taxonomía

A continuación, se describe la Taxonomía de *Sclerotium rolfsii* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Sclerotium rolfsii* (NCBI, 2021).

Dominio	Eukaryota
Reino:	Fungi
División:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Orden:	Atheliales
Familia:	Atheliaceae
Género:	<i>Sclerotium</i>
Especie:	<i>S. rolfsii</i>

#### 2.4.3 Descripción morfológica

La fase sexual o teleomorfo de *S. rolfsii* es conocida como *Athelia rolfsii* y se caracteriza por la formación de micelio abundante, forma abanicada y color blanquecino. No es formador de esporas, pero produce estructuras de resistencia denominadas esclerocios (Agrios, 1999). Sus hifas pueden ser de dos tipos, las

principales que poseen de 5 a 9 micrones de diámetro, tienen paredes hialinas y delgadas. Hacen conexiones en forma de gancho al nivel de las septas, esta característica permite identificar a la especie (Barnett & Barry, 1987).

El otro tipo de hifa es considerada como alimentadora, son las encargadas de la penetración en el tejido de las plantas. El micelio crece expandiéndose en forma de un abanico de color blanco. Además, el micelio forma rizomorfos que se expanden, se entrecruzan y forman los esclerocios esféricos, que adquieren un color café oscuro cuando maduran (Figura 1). Llegan a medir hasta 10 mm de diámetro, pero normalmente se encuentran en rangos de 0.5 a 2.0 mm de diámetro (Singh & Dwivedi, 1991).

Durante la formación y desarrollo del esclerocio cultivado en medio artificial se llegan a producir gotas de exudado compuestas de cationes, proteínas, carbohidratos, aminoácidos, enzimas y ácido oxálico (Christias, 1980). Cuando maduran se componen de aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, además crea una corteza exterior melanizada (Chet & Henis, 1968).

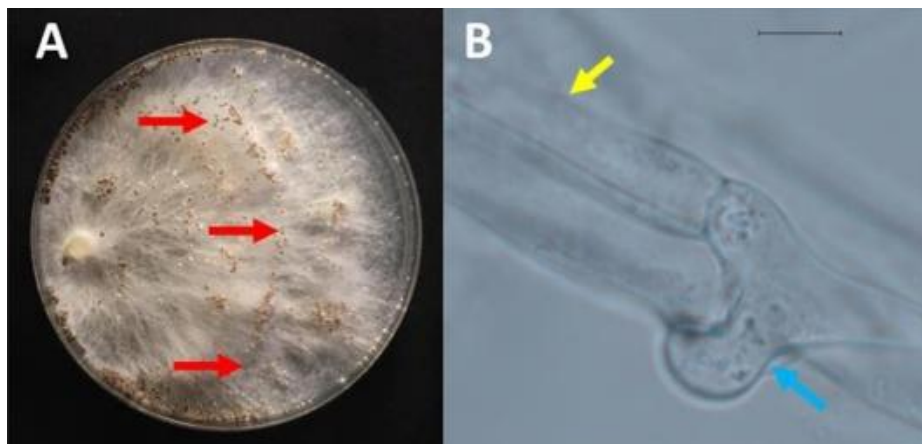


Figura 1. Características morfológicas de *Sclerotium rolfsii* (A) Morfología colonial en medio PDA, y esclerocios (flechas rojas); (B) Hifa hialina (flecha amarilla), y fíbulas (flecha azul) (100x). Escala: (B= 50  $\mu$ m) (Irazoqui, 2021).

#### 2.4.4 Desarrollo de la enfermedad y síntomas

El ciclo de enfermedad por *S. rolfsii* comienza cuando el esclerocio germina y las hifas emergentes crecen y entran en contacto con tejidos susceptibles: raíces, bubos, frutos, hojas y heridas que permitan la penetración. Una vez dentro del hospedero, el hongo forma ácido oxálico y celulasa, de tal forma que esto provoque la separación y muerte de las células. Después de la infección los síntomas de la podredumbre blanda aparecen de dos a cuatro días. Cuando el hongo rodea la parte inferior del tronco o el tallo resulta en la muerte regresiva de las ramas, marchitez de hojas y la muerte de la planta (Figura 2) (Mullen, 2001).

La enfermedad se continúa propagando cuando las hifas llegan a tejidos sanos y las condiciones ambientales de temperaturas cálidas a altas y húmedas lo permiten (Mullen, 2001).



Figura 2. Infección por *S. rolfsii* en la parte inferior del tallo de una berenjena, provocando el colapso total de la planta (Langston, 2023).

#### 2.4.5 Control químico de *Sclerotium rolfsii*

La producción de esclerocios que sobrevive en el suelo por años ha hecho difícil el control de *S. rolfsii*. Los primeros fumigantes efectivos que se utilizaron para el control de *S. rolfsii* fueron el bromuro de metilo, metam sodio y vorlex (una mezcla

de metil isotiocianato, dicloropropano y otros clorinatos). Sin embargo, debido al efecto nocivo al ambiente se prohibió su uso (Jenkins & Averre, 1986; Jenkins, 1985; Punja, 1985).

Existen fungicidas que logran inhibir la germinación y formación de esclerocios, así como el crecimiento micelial, entre ellos el pentacloronitrobenceno (PCNB). In vitro demostró ser efectivo para minimizar el número de esclerocios (Punja *et al.*, 1982); en campo se utilizó como control de *S. rolfsii* en cultivos de cacahuete desde los años 1940's (Shim *et al.*, 1998). Se reportó que la aplicación de PCNB de 11.2 a 22.4 kg i.a./ha disminuyó la incidencia del tizón sureño en zanahoria (Jenkins & Averre, 1986). Sin embargo, Pineda & Díaz (1981) reportaron un efecto fungicida en la superficie del suelo, pero debajo del suelo causó un mayor crecimiento micelial, acompañado de una abundante formación de esclerocios.

En el estudio realizado por Ramírez *et al.* en 1998 sobre el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero, se determinó que la combinación de vinclozólín, clorotalonil, humus líquido y humus de lombrices fue eficaz, logrando un control del 91.56% sobre *S. rolfsii*. De manera individual, se observó que vinclozólín destacó como el fungicida más efectivo.

No obstante, se señala que el uso de algunos fungicidas, como PCNB, puede tener impactos negativos en las poblaciones saprófitas y de actinomicetos antagonistas de fitopatógenos. PCNB, en particular, se identifica como un fungicida que ejerce una presión selectiva favorable para hongos de los géneros *Fusarium* y *Pythium*, según lo indicado por Pineda & Díaz en 1981. Así mismo, se enfatiza que los efectos de la aplicación de fungicidas pueden variar según la estación del año y el tipo de cultivo, según Punja, 1985.

## **2.5 Alternativas de Control Biológico**

El control biológico, conocido también como biocontrol, es una alternativa al uso de plaguicidas enfocado en la protección de los cultivos contra diversos microorganismos fitopatógenos que pueden perjudicar su crecimiento y desarrollo (Kumar *et al.*, 2021). En este sentido, diversos microorganismos son reconocidos

como agentes de control biológico y se presentan en una amplia gama de formulaciones. Pueden ser clasificados funcionalmente en biocontroladores (manejo de plagas y enfermedades), bioestimulantes (favorecen el crecimiento) y biofertilizantes (favorecen la captura de nutrientes) (Muñoz-Torres, 2018).

Estos bioproductos se han empleado con el propósito de mejorar el rendimiento de los cultivos, ofreciendo una alternativa a los fertilizantes y plaguicidas convencionales, ya que presentan características biodegradables y poseen una baja o nula toxicidad para las personas y el ecosistema (Muñoz-Torres, 2018). Los microorganismos de biocontrol también han emergido como una opción para el control de enfermedades después de la cosecha. Hasta el momento, diversos microorganismos son identificados por su eficacia como agentes de control (Nguyen *et al.*, 2021). Tales como hongos entomopatógenos, levaduras y bacterias que producen metabolitos capaces de dañar al patógeno sin ser perjudicial para el medio ambiente ni para el ser humano (Farías-Vázquez, 2023).

## **2.6 Compuestos orgánicos volátiles microbianos**

Los microorganismos requieren energía para su crecimiento y reproducción, y emplean un sistema químico complejo para convertir los sustratos disponibles en fuentes de energía utilizables, generando así biomasa microbiana. Esta energía metabólica puede también destinarse al metabolismo secundario, como la producción de toxinas/antibióticos y compuestos orgánicos volátiles (COV's), especialmente en presencia de otros microorganismos competidores (Misztal *et al.*, 2018).

En comparación con otros metabolitos secundarios, los volátiles suelen ser compuestos pequeños, con una masa molecular baja (100-500 Dalton). Además, poseen alta presión de vapor y un bajo punto de ebullición. Estas características facilitan su evaporación y difusión a través de poros llenos de agua y gas en ambientes de suelo y rizosfera (Schmidt *et al.*, 2015).

Los COV's se originan principalmente a partir de la oxidación de la glucosa y otros intermediarios. Aproximadamente una cuarta parte de los genes microbianos están

dedicados a la síntesis de diversas moléculas que participan en la comunicación química, y durante este proceso metabólico, se liberan compuestos con diferentes grados de volatilidad, algunos no volátiles, otros semivolátiles y otros volátiles, desde las células microbianas (Misztal *et al.*, 2018).

Actualmente se ha descrito la estructura química de poco más de 1000 volátiles que se originan en una gran gama de géneros y especies de bacterias y hongos (Effmert *et al.*, 2012; Lemfack *et al.*, 2014). Los volátiles de origen bacteriano suelen estar dominados por alquenos, alcoholes, cetonas, terpenos, benzenoides, pirazinas, ácidos y ésteres mientras que los volátiles fúngicos están dominados por alcoholes, bencenoides, aldehídos, alquenos, ácidos, ésteres y cetonas (Piechulla & Degenhardt, 2014).

Sin embargo, así como los volátiles de origen microbiano varían según el organismo, también pueden mostrar similitudes entre microbios de un mismo género (Choudoir *et al.*, 2019) o entre una misma especie (Guevara-Avendaño *et al.*, 2019), pero también tener ciertas singularidades por parte de cada uno. Estas condiciones pueden variar debido a la constitución de los medios (Morita *et al.*, 2019), la consistencia (Qadri *et al.*, 2015), la fase de crecimiento (Yang *et al.*, 2019), la humedad, contenido de agua, temperatura (Misztal *et al.*, 2018) y las interacciones con otros microorganismos (Delgado *et al.*, 2021).

Debido a la variada dinámica de los COV's microbianos, estos pueden incidir en complejas interacciones tróficas ambientales (Bitas *et al.*, 2013). En este contexto, estas moléculas desempeñan una función crucial como infoquímicos en las interacciones microbianas, influyendo en el desarrollo y comportamiento de una amplia gama de organismos, tales como otros microorganismos, plantas y animales (Bitas *et al.*, 2013; Kanchiswamy *et al.*, 2015).

## **2.7 Funciones de los COV's bacterianos en las interacciones microbianas**

### **2.7.1 COV's bacterianos como antagonistas de hongos**

Los COV's producidos por bacterias poseen bajos pesos moleculares y polaridades, esto facilita su difusión a través de estructuras porosas en el suelo y a



distancias considerables en la atmósfera. Estas características son relevantes en diversas aplicaciones en entornos como campos de cultivo, invernaderos, o almacenamiento (Arrarte *et al.*, 2017). Debido a esto, numerosos estudios han destacado las posibles aplicaciones de los COV's bacterianos en el manejo de enfermedades precosecha (Calvo *et al.*, 2020).

Los microorganismos antagonistas, como hongos, levaduras y bacterias, generan metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, entre los cuales los COV's juegan un papel clave al inhibir el crecimiento de hongos patógenos (Dukare *et al.*, 2019). Estos microorganismos producen una forma de inhibición llamada antibiosis, que implica la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos secundarios producidos por un microorganismo sobre otro sensible a ellos (Pedraza *et al.*, 2020). Los metabolitos secundarios volátiles, a pesar de no establecer contacto físico, logran inhibir el desarrollo de otros microorganismos, alterando su actividad enzimática y la expresión de sus genes (Rivas, 2018).

En el caso de *F. solani* y *F. kuroshium*, hongos que causan marchitez en el aguacate y otros cultivos, se ha observado que rizobacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* emiten COV's como cetonas, pirazinas, quinazolinas, alcoholes y compuestos azufrados que tienen un efecto antifúngico (Guevara-Avendaño *et al.*, 2019; Báez-Vallejo *et al.*, 2020). Algunos de estos COV's, (2,3,5-trimetilpirazina, 2-nonanona, 2-decanona, dimetildisulfuro y dimetil-trisulfuro), evaluados como estándares comerciales, mostraron una inhibición del 100% en el crecimiento micelial de *F. solani* en condiciones in vitro (Guevara-Avendaño *et al.*, 2019). Específicamente, se ha señalado que la cetona-2-nonanona posee propiedades antimicóticas contra especies de *Fusarium*, según estudios previos (Yuan *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2019). Además, la presencia de cetonas, pirazinas y compuestos que contienen azufre, son los principales COV's que han sido previamente reportados con actividad antifúngica (Guevara-Avendaño *et al.*, 2019).

Por otro lado, Calvo *et al.*, (2020) demostraron que los COV's producidos por *Bacillus velezensis* inhiben de manera significativa el crecimiento de *Botrytis*

*cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium expansum*, tanto in vitro como en frutas. Donde se destacó la inhibición en *M. laxa* (66 %), *M. fructicola* (72 %), *P. italicum* (80 %) y *B. cinerea* (100 %). Estos COV's incluyen principalmente 2-nonanona, 2-undecanona, 2-heptanona, 1-butanol, acetoína, benzaldehído, formiato de butilo, diacetilo, nonano o pirazina, entre otros.

El potencial inhibidor debido a COV's también se ha registrado en *Pseudomonas* sp. (N° 3, N° 35), *Enterobacter* sp. (No. 26, No. 34), *Ralstonia* sp. (n° 50), *Bacillus* sp. (n° 62), *Arthrobacter* sp. (N° 146), *Brevibacillus* sp. (No. 2-18) y *Paenisorosarcina* sp. (No. 2-60) con efectos inhibidores que van desde 7,84 al 100 % sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani*. Específicamente, la cepa *Ralstonia* sp. logra inhibir por completo el crecimiento de *R. solani* gracias a la producción de COV's, los cuales incluyen: éster etílico del ácido benzoico, ácido 3-metil-butanoico, 2-etil-1-hexanol, 3-metil-1-butanol y 6-metil-5-hepten-2-ona (Wang *et al.*, 2021).

### **2.7.2 Mecanismo antifúngico de los COV's**

Hasta ahora se ha documentado que los COV's microbianos ejercen su efecto antifúngico principalmente a través de la alteración de las estructuras de la membrana y la pared celular, lo cual conlleva a la pérdida de componentes intracelulares, vacuolización, ruptura de hifas y, finalmente, a la desintegración de la morfología celular del hongo (Zhao *et al.*, 2022). Además, se ha observado que estos compuestos generan un desequilibrio redox mediante la acumulación de especies reactivas de oxígeno, lo que induce estrés oxidativo y activas respuestas como la expresión de enzimas antioxidantes (por ejemplo, SOD y catalasa). A nivel molecular, los COV's también interfieren con rutas metabólicas clave, regulando negativamente genes asociados al metabolismo energético, la expresión de transportadores ABC y la producción de factores de virulencia, incluyendo CAZymes y proteínas de señalización (Almeida *et al.*, 2023) (Figura 3).

En un estudio realizado por Tahir *et al.*, (2017), se observó que el benzaldehído, la

1,2-benzotiazol-3-ona y el buta-1,3-dieno liberados por *Bacillus spp.* provocaron cambios morfológicos y ultraestructurales en las células de *Ralstonia solanacearum*. Asimismo, en otro trabajo, Wang *et al.*, (2021b) evidenciaron la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* mediante la regulación negativa de la expresión génica inducida por *B. subtilis* CF -3 VOC. Esta regulación estuvo vinculada con la fluidez de la membrana celular, la integridad de la pared, el metabolismo energético y la producción de enzimas que degradan la pared celular.

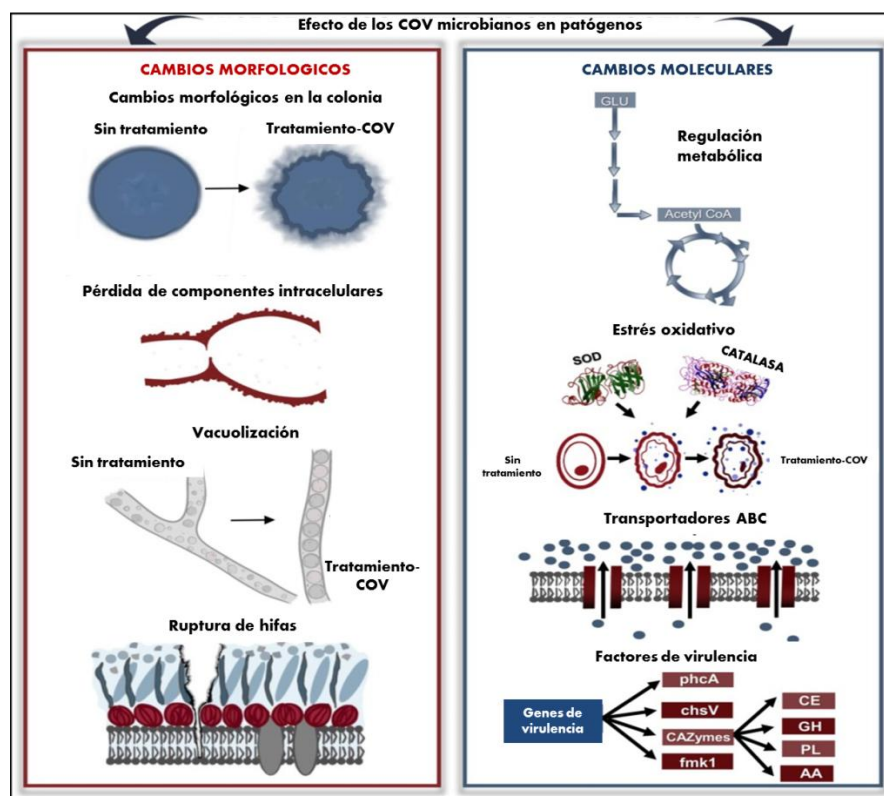


Figura 3. Efecto de los COV's microbianos en hongos fitopatógenos (Modificado de Almeida *et al.*, 2023).

Los compuestos orgánicos volátiles también modifican la permeabilidad de la membrana fúngica mediante la peroxidación de los lípidos presentes en la misma. En este sentido, los COV's provenientes de *A. pullulans* tienen la capacidad de

desencadenar la peroxidación lipídica y la fuga de electrolitos en *B. cinerea* y *A. alternata*, según lo reportado por Yalage-Don *et al.*, (2021). Por otro lado, la exposición de *Psidium guajava* a los COV's de *S. cerevisiae* resultó en un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática debido a la peroxidación lipídica, (Dalilla *et al.*, 2015). Es importante destacar que la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) altera la composición de la capa lipídica, desencadenando la peroxidación lipídica mediante la conversión de lípidos insaturados en hidroperóxidos lipídicos polares, terminando en muerte celular (Soto *et al.*, 2006).

Recientemente se han incorporado enfoques de biología molecular para comprender los mecanismos por los cuales surge la inhibición del crecimiento de fitopatógenos. Se han identificado cepas del género *Pseudomonas* que inhiben en un 80 % el crecimiento del hongo fitopatógeno *Thielaviopsis ethacetica*. Donde, a través de análisis moleculares determinaron que los compuestos volátiles producidos por estas bacterias reducen la expresión de genes relacionados con el metabolismo del hongo, especialmente en el metabolismo de carbohidratos. También aumentan la expresión de genes relacionados con la respuesta al daño del ADN, indicando que los compuestos volátiles causan daño a la macromolécula (Freitas *et al.*, 2022).

También se demostró que un tratamiento de  $\alpha$ -humuleno en *Fusarium oxysporum* inhibe la expresión de dos genes de virulencia, *fmk1* y *chsV*. El gen *fmk1* es responsable de la codificación de una proteína quinasa activada por mitógenos, la cual controla una serie de pasos fundamentales que regulan la infección de las plantas y el crecimiento de hongos en el tejido vegetal vivo, según lo indicado por Roncero *et al.* (2003). Por otro lado, el gen *chsV* codifica una proteína homóloga a la quitina sintasas de clase V, desempeñando un papel crucial en la biosíntesis de la pared celular para favorecer la adhesión de patógenos (Liu *et al.*, 2017).

Los COV's liberados por *Bacillus amyloliquefaciens* también ejercen influencia sobre los factores de virulencia del fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* (Raza *et al.* 2016). Estos compuestos volátiles redujeron significativamente la expresión de

los genes *katG* y *sobB*, los cuales están asociados con la actividad antioxidante, así como del regulador transcripcional PhcA. Este último es un regulador dependiente de la densidad celular, desempeña un papel crucial en el control de la expresión de factores de virulencia tales como polisacáridos extracelulares (EPS), y enzimas degradadoras de la pared celular como las endoglucanasas y la motilidad bacteriana (Genin *et al.* 2005; Khokhani *et al.* 2017).

### 2.7.3 Influencia de los COV's bacterianos en colonias bacterianas

Las bacterias presentes en el suelo coexisten en comunidades complejas formadas por múltiples especies, donde los COV's desempeñan un papel crucial en las interacciones entre diversos microorganismos. Estas moléculas no solo actúan como agentes antimicrobianos al suprimir microorganismos competidores, sino también como señales químicas capaces de modular el comportamiento y la expresión genética de los organismos receptores, afectando procesos clave como la motilidad, la virulencia, la formación de biofilms, la producción de metabolitos secundarios o la resistencia a antibióticos (Figura 4) (Vasseur-Coronado *et al.*, 2021). A continuación, se describen distintos estudios que han evidenciado estas respuestas en bacterias expuestas a COV's microbianos.

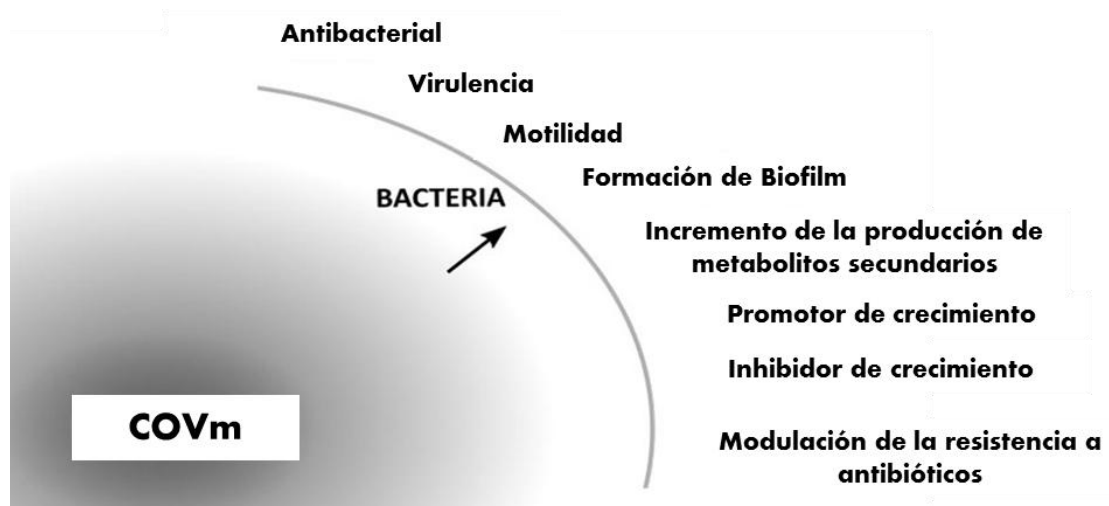


Figura 4. Respuestas en bacterias causadas por COV's microbianos producidos por bacterias (Modificado de Schulz-Bohm *et al.*, 2017).

Se han caracterizado múltiples ejemplos de estas interacciones mediadas por volátiles entre bacterias del suelo. En uno de ellos, se observó que los volátiles producidos por *Collimonas pratensis* y *Serratia plymuthica* estimularon el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*. Los análisis genéticos revelaron fuertes diferencias en la expresión de genes de *P. fluorescens* cuando se exponen a volátiles emitidos por las diferentes especies bacterianas, entre ellos genes que participan en el transporte y metabolismo de aminoácidos, la producción y conversión de energía, los mecanismos de transducción de señales, el transporte y el metabolismo de iones inorgánicos, la secreción y la motilidad celular (Garbeva *et al.*, 2014).

Por otro lado, Vasseur- Coronado *et al.*, (2021) investigaron la interacción entre dos rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas de tomate. Los COV's producidos por *Pantoea agglomerans* MVC 21 afectaron la liberación de sideróforos y la solubilización de fosfato y potasio por *Pseudomonas putida* MVC 17. Estos COV's también aumentaron la densidad de raíces laterales, raíces y brotes. En particular, los COV's de *P. agglomerans* MVC 21 mejoraron la capacidad de *P. putida* MVC 17 para aumentar la densidad de raíces laterales y el peso seco de las raíces de plántulas de tomate. El disulfuro de dimetilo y los COV's de *P. agglomerans* MVC 21 parecen estar vinculados a la producción de ácido 3-indolacético en *P. putida* MVC 17.

Estos resultados indican que *P. agglomerans* MVC 21 puede establecer una interacción beneficiosa con *P. putida* MVC 17 y plantas de tomate mediante la emisión de disulfuro de dimetilo. Además, estos hallazgos sugieren la posibilidad de que estas dos rizobacterias coexistan en condiciones naturales y compartan nichos ecológicos en aplicaciones de campo. Desde una perspectiva práctica, esto sugiere la viabilidad de combinar estas cepas en un producto bioestimulante, como ya se ha informado para otras combinaciones de rizobacterias promotoras del crecimiento. Desde un punto de vista ecológico, estos resultados respaldan la idea de cómo los géneros *Pantoea* y *Pseudomonas* pueden coexistir e interactuar en el fitobioma (Vasseur- Coronado *et al.*, 2021).

Además, Kwang-sun *et al.*, (2012) demostraron que estos compuestos orgánicos son capaces de alterar la expresión genética de bacterias receptoras mediante mecanismos de regulación transcripcional y modulación fenotípica. Por ejemplo, en interacciones entre *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, los COV's como la 2,3-butanodiona y el ácido glioxílico inducen cambios globales en la expresión de genes relacionados con la motilidad, la resistencia a antibióticos y la síntesis de proteínas, afectando la adaptabilidad del receptor al entorno.

Los COV's actúan como señales moleculares que, incluso en ausencia de contacto físico entre las bacterias, desencadenan respuestas rápidas y específicas al modular factores transcripcionales clave. Por ejemplo, en *E. coli*, el gen *ypdB* actúa como un regulador maestro que media la respuesta a los COV's, activando factores como *soxS*, *rpoS* y *yjyU*. Estos regulan rutas metabólicas relacionadas con la resistencia a antibióticos y la formación de biofilms, lo que subraya la importancia de estas señales en la supervivencia bacteriana en ambientes hostiles (Kim *et al.*, 2013).

Los mecanismos específicos de esta regulación incluyen la activación de genes del sistema toxina-antitoxina (TA), que favorecen la formación de células persistentes, y la supresión de genes asociados a la motilidad, como *motA* y *fliA*. Estas respuestas fenotípicas muestran que los COV's no solo facilitan la comunicación interbacteriana, sino que también actúan como herramientas para la defensa y la competencia en comunidades microbianas (Kim *et al.*, 2013).

## **2.8 *Kosakonia cowanii***

### **2.8.1 Características**

*Kosakonia cowanii* es una bacteria gram-negativa proveniente de la familia Enterobacteriaceae, se ha registrado como patógeno de plantas y humanos, pero también está asociado a bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Jan *et al.*, 2020). La primera cepa tipo se aisló de la sangre de un paciente como NIH grupo 42, aunque anteriormente se había encontrado en plantas, suelo y fórmula infantil

(Yang *et al.*, 2018).

Es una bacteria móvil gracias a la presencia de flagelos peritricos y tiene forma de bastoncillo o varilla recta de 0.5-1.2  $\mu\text{m}$  x 1.0-3.5  $\mu\text{m}$  (Yang *et al.*, 2018). Su temperatura óptima para el crecimiento es de 28-30 ° C, pero crece a 40 ° C. Las colonias del género *Kosakonia* suelen ser de un color blanco a beige, redondos, convexos y lisos con márgenes enteros en el agar de soya triptona, sin embargo, las cepas de *K. cowanii* pueden ser de pigmentación amarilla (Jan *et al.*, 2020).

Se le ha considerado como una bacteria promotora del crecimiento de plantas (PGPB) en algunas especies, como solanáceas o poáceas. Las características producidas por las PGPB son de suma importancia, pues se ha demostrado que las mutaciones de estos rasgos causan un lento crecimiento o desarrollo en la planta. Muchas especies del género *Kosakonia* poseen estas características, aunque el rasgo más general de este grupo es su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Jan *et al.*, 2020).

### **2.8.2 Distribución de la especie**

*Kosakonia cowanii* tiene la capacidad de vivir en distintos ambientes y condiciones donde suele ser altamente competitiva y además posee un gran potencial metabólico. En agua y aguas residuales se identificó como parte de los microorganismos que forman biopelículas (Mulinari *et al.*, 2020). En plantas, esta bacteria es endófito en nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*) (Noori *et al.*, 2018) y en la artemisa (*Artemisa nilagirica*), una planta medicinal tradicional de Asia (Ashitha *et al.*, 2019). También ha sido encontrada en diversas fuentes como son aceites, agua, y una gran diversidad de alimentos procedentes del campo como la soya y el melón (Jan *et al.*, 2020). Además, recientemente se aisló de muestras de chile en polvo derivado de *Capsicum annuum* L. (Hernández-Gómez *et al.*, 2022).

### **2.8.3 Inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por *Kosakonia cowanii* mediante la producción de COV's.**

La cepa *Kosakonia cowanii* Ch1 ha sido aislada a partir del chile en polvo mexicano



donde se evaluó su producción de COV's contra patógenos fúngicos, donde reveló una inhibición de aproximadamente el 70 % y 64 % en el crecimiento micelial radial de *Alternaria alternata* y *Sclerotium rolfsii*, mientras que la inhibición de *Fusarium oxysporum* fue de alrededor del 10 %. Además, se identificaron 67 COV's potenciales durante su fermentación y nueve compuestos fueron los más abundantes (ácido dodecanoico, 3-hidroxi; etanol; 1-butanol-3-metilo; acetaldehído; ácido butanoico, éster butílico; ciclodecano; 2-butanona, 3-hidroxi; disulfuro, dimetilo; y pirazina-2,5-dimetilo) (González-Espinosa *et al.*, 2023).

Estos compuestos se han detectado en otras bacterias con efectos antifúngicos, antibacterianos y modificadores de la expresión genética. Sobre todo, los que pertenecen a la familia de los alcoholes, cetonas y pirazinas (Rana *et al.*, 2024; He *et al.*, 2020; Calvo *et al.*, 2020). Sin embargo, aún no se han descrito en su totalidad el mecanismo de la alteración de la expresión. Esta investigación muestra el potencial de *K. cowanii* Ch1 en el control biológico de patógenos fúngicos a través de la producción de COV's, además de mostrar características metabólicas adicionales que respaldan su papel como una especie bacteriana beneficiosa (González-Espinosa *et al.*, 2023).

### **3. Hipótesis**

La eficacia de *Kosakonia cowanii* Ch1 como agente de biocontrol frente a *Sclerotium rolfsii* podría potenciarse mediante la modulación de su expresión genética inducida por sus propios compuestos orgánicos volátiles, lo que favorecería su desempeño competitivo durante la interacción.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Determinar los mecanismos regulatorios de COV's en la expresión genética de *Kosakonia cowanii* Ch1 durante la competencia contra *Sclerotium rolfsii*

### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad de la mezcla compleja de COV's y *Kosakonia cowanii* Ch1 durante su interacción con *Sclerotium rolfsii*.
2. Analizar e identificar mediante transcriptómica los genes diferencialmente expresados en *Kosakonia cowanii* Ch1 durante la competencia directa con *S. rolfsii*.
3. Identificar mediante transcriptómica los genes expresados en *Kosakonia cowanii* Ch1 en competencia con *Sclerotium rolfsii* y en presencia de sus propios COV's, para entender el efecto modulador de los volátiles en la respuesta bacteriana.

## **5. Metodología**

### **5.1 Sitio de estudio**

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos, ubicado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### **5.2 Condiciones de crecimiento de *Kosakonia cowanii* Ch1**

Se sembró la cepa de *K. cowanii* Ch1 previamente aislada por el Laboratorio de Biología Molecular de Microorganismos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en agar Soya Trypticase (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.) Las bacterias se incubaron a una temperatura de 37 °C.

### **5.3 Material fúngico**

Se obtuvo una cepa del hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* del Laboratorio de Biotecnología Vegetal y Agrícola de la Universidad Autónoma de Querétaro. Posteriormente se cultivó en un medio de papa dextrosa (PDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.) y se incubó a una temperatura de 28 °C.

### **5.4 Prueba in vitro de la interacción de los COV's con *Kosakonia cowanii* Ch1 y *Sclerotium rolfsii***

Con el objetivo de evaluar el efecto que tuvieron los COV's de *K. cowanii* Ch1 sobre *S. rolfsii* se llevó a cabo la técnica de placas intercaladas (Calvo *et al.*, 2020) con las siguientes modificaciones.

Para la parte inferior se utilizó un cultivo de *K. cowanii* Ch1 del cual se tomó un inóculo y se suspendió en 500 µL de agua peptonada al 0.1 % con una concentración de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>. Posteriormente se tomaron 100 µL de esta dilución y se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo agar Soya Trypticase (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.) para sembrar por extensión en el medio con una varilla de vidrio estéril y formar un tapete bacteriano.

Por otro lado, para la placa superior se colocó un disco de 5 mm de micelio de *S. rolfii* en placas Petri con medio de papa dextrosa (PDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EE. UU.) y alrededor de este se inoculó 20 µL de la dilución bacteriana antes mencionada.

La unidad experimental consistió en las dos cajas Petri colocadas una sobre otra. La caja Petri con agar soya tripticasa y el tapete bacteriano en la parte inferior permitieron que los COV's producidos por *K. cowanii* Ch1 pudieran volatilizarse y alcanzar la caja superior. Por otro lado, la caja con agar de papa dextrosa, el disco del hongo y la suspensión bacteriana en la parte superior permitieron una inhibición de la bacteria al hongo, potenciada por los COV's que recibió de la caja inferior. Ambas cajas se sellaron con PARAFILM (papel parafilm® 100mm x 75m, natural) como se observa en la Figura 5 y se incubará a 28 °C.

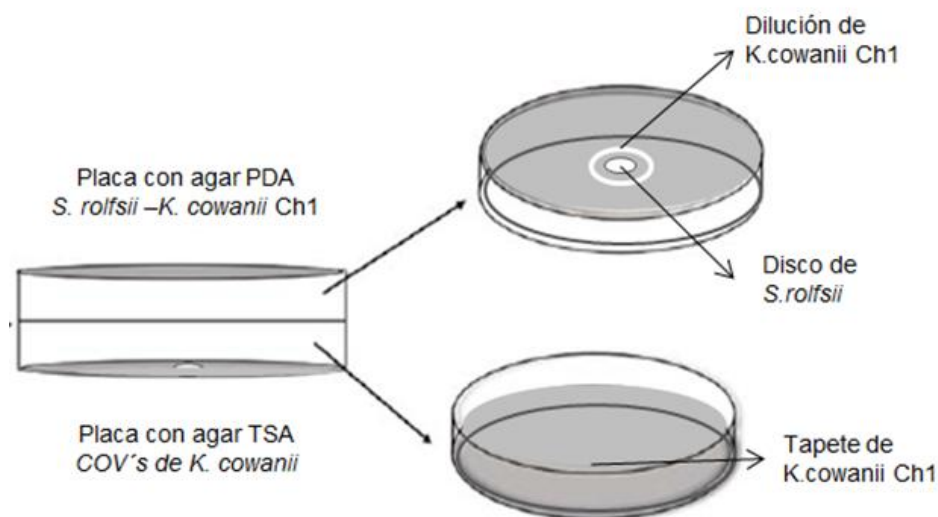


Figura 5. Representación del método de placas intercaladas para *K. cowanii* Ch1, COV's y *S. rolfii* (Modificado de Ninoska *et al.*, 2021).

Para comparar el efecto antagónico de *K. cowanii* Ch1 y su efecto sinérgico con los COV's se realizaron los siguientes tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos en la sinergia de *K. cowanii* Ch1 y los COV's para inhibir a *Sclerotium rolfsii*. Donde "H" es *S. rolfsii* y "B" es *K. cowanii* Ch1.

Tratamiento	Representación		
1: Interacción microbiana Hongo + Bacteria + COV's (H+B   COV's)	<table><tr><td>H+B</td></tr><tr><td>COV's</td></tr></table>	H+B	COV's
H+B			
COV's			
2: Interacción microbiana Hongo + Bacteria (H+B   TSA)	<table><tr><td>H+B</td></tr><tr><td>TSA</td></tr></table>	H+B	TSA
H+B			
TSA			
3: Interacción microbiana Hongo + COV's (H   COV'S)	<table><tr><td>H</td></tr><tr><td>COV's</td></tr></table>	H	COV's
H			
COV's			
Control: hongo (H)	<table><tr><td>H</td></tr></table>	H	
H			

Este proceso se realizó en triplicado para cada tratamiento. Para determinar si existe una inhibición en *S. rolfsii* se llevó a cabo la medición radial del micelio (Dennis, y Webster, 1971), utilizando la ecuación 1 para analizar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (mgi)

$$\text{mgi (\%)} = \frac{(dc - dt)}{dc} \times 100 \quad (1)$$

En donde el término dc (en mm) representa los diámetros promedio de las colonias de grupos control y dt (en mm) representan los diámetros promedio de las colonias de los grupos tratamiento.

## 5.5 Análisis transcriptómicos

Tras confirmar el efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) y su sinergia con *K. cowanii* Ch1 sobre *S. rolfsii*, se llevaron a cabo análisis transcriptómicos con el objetivo de caracterizar la expresión génica global de *K. cowanii* Ch1 bajo distintas condiciones experimentales. Estos análisis permitieron identificar genes diferencialmente expresados en respuesta a la presencia del hongo y/o sus propios COV's, así como los cambios transcriptómicos asociados a una mayor capacidad competitiva y actividad antagónica frente a *S. rolfsii*.

### 5.5.1. Extracción de RNA

Se tomaron muestras de *K. cowanii* Ch1 en diferentes condiciones experimentales *in vitro*: (1) solo la bacteria, (2) en interacción con *S. rolfsii*, (3) en interacción con COV's y en presencia de *S. rolfsii*. Las muestras se seleccionaron dependiendo de cuál de los tratamientos mencionados anteriormente mostró cambios fenotípicos significativos en la bacteria y en la inhibición del crecimiento del hongo, con el objetivo de asociar estos cambios a respuestas moleculares y genéticas. Las 3 pruebas para la transcriptómica se realizarán por duplicado para tener una mayor significancia estadística.

El ARN total de cada muestra se extrajo utilizando el kit de reactivos RNA-fungal-bacterial-miniprep-kit (Zymo Research, CA, EE. UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 5.5.2 Preparación de bibliotecas para ARN-Seq

Las muestras fueron enviadas a Zymo Research para el servicio completo de RNA-Seq. Las bibliotecas se construyeron a partir de muestras de ARN total utilizando el kit Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Prep (Cat # R3000), siguiendo las instrucciones del fabricante (manual v1.3.0). En resumen, primero se llevó a cabo la depleción del ARN ribosomal (rRNA) para eliminar las secuencias no informativas, asegurando así que las bibliotecas contuvieran principalmente ARN mensajero. Posteriormente, el ARN restante fue retrotranscrito a ADN

complementario (cDNA), seguido por la síntesis de la segunda cadena y la ligación de un adaptador parcial P5 al extremo 5' del ADN de doble cadena. Finalmente, las bibliotecas se amplificaron para incorporar adaptadores de longitud completa bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos; 10-16 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineamiento a 60 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 60 segundos; y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

La construcción exitosa de las bibliotecas fue confirmada mediante el ensayo D1000 ScreenTape de Agilent en un TapeStation. Las bibliotecas de RNA-Seq se secuenciaron en un equipo Illumina NovaSeq, alcanzando una profundidad de secuenciación de al menos 30 millones de pares de lecturas (lectura pareada de 150 pb) por muestra.

### **5.5.3 Análisis Bioinformático**

El análisis bioinformático se llevó a cabo utilizando la canalización de RNA-Seq de Zymo Research, basada en nf-core/rnaseq pipeline v1.4.2 (<https://github.com/nf-core/rnaseq>), desarrollada con Nextflow (<https://www.nextflow.io/>). En resumen, se realizó un control de calidad de las lecturas crudas con FastQC v0.11.9 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Las secuencias de baja calidad y los adaptadores fueron eliminados utilizando Trim Galore! v0.6.6 ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore)). Posteriormente, las lecturas recortadas se alinearon con el genoma de referencia de *K. cowanii* Ch1 (número de acceso del genoma en NCBI: JAUDFU000000000) utilizando STAR v2.6.1d (<https://github.com/alexdobin/STAR>), y los archivos BAM resultantes fueron filtrados e indexados con SAMtools v1.9 (<https://github.com/samtools/samtools>).

El control de calidad de las bibliotecas de RNA-Seq fue implementado con RSeQC v4.0.0 (<http://rseqc.sourceforge.net/>) y QualiMap v2.2.2-dev (<http://qualimap.conesalab.org/>). Las lecturas duplicadas fueron marcadas utilizando Picard tools v2.23.9 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), y la



complejidad de las bibliotecas fue estimada con Preseq v2.0.3 (<https://github.com/smithlabcode/preseq>). El análisis de la tasa de duplicación fue realizado con dupRadar v1.18.0 (<https://bioconductor.org/packages/dupRadar/>). Las lecturas que se solapaban con exones fueron asignadas a genes utilizando featureCounts v2.0.1 (<http://bioinf.wehi.edu.au/featureCounts/>), basándose en anotaciones y rRNA de RepeatMasker del navegador UCSC Genome Browser.

El análisis de expresión diferencial de ARN se realizó mediante DESeq2 v1.28.0 (<https://bioconductor.org/packages/DESeq2/>) entre los grupos diferentes (y por edgeR entre muestras). Los genes/transcripciones con el parámetro de tasa de descubrimiento falso (FDR) por debajo de 0.05 y cambio absoluto  $\geq 1$  se consideraron genes/ transcripciones con una expresión diferencial, influyendo una modificación de la expresión genética de *Kosakonia cowanii* Ch1. Por otro lado, el análisis de enriquecimiento funcional se realizó utilizando la API de g: Profiler v1.0.0 (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Finalmente, los resultados de control de calidad y análisis se visualizaron mediante MultiQC v1.9 (<https://github.com/ewels/MultiQC>).

#### **5.5.4 Genes de interés y Análisis de enriquecimiento de vías**

Para comprender mejor las funciones biológicas de los DEG, se utilizó el enriquecimiento de KEGG, una base de datos pública de información de vías. El análisis de enriquecimiento ayuda a comprender mejor las funciones biológicas de los genes. Identificando vías metabólicas significativamente enriquecidas o vías de transducción de señales en DEG que estén involucrados principalmente en las vías del metabolismo bioquímico y la transducción de señales (Yue *et al.*, 2023).

Considerando la capacidad de los compuestos volátiles microbianos para influir directamente en las vías biosintéticas de los organismos diana, el análisis de transcriptómica se centró en una selección independiente de genes. Esta selección se basó principalmente en aquellos genes asociados con la biosíntesis y la actividad antagónica de la bacteria *K. cowanii* Ch1 frente al hongo fitopatógeno *S. rolfsii*.

Por lo tanto, nos dedicamos a la búsqueda de genes asociados con aspectos importantes como la motilidad, la virulencia, la competencia y la biosíntesis de COV's que a su vez pueden afectar el metabolismo, el crecimiento celular y la sobreproducción de metabolitos secundarios de la propia bacteria (Weisskopf *et al.*, 2022). Esto nos permitió identificar no solo los genes involucrados en la producción de compuestos volátiles con actividad antifúngica, sino también aquellos que regulan la respuesta de la bacteria ante la presencia del hongo fitopatógeno.

### **5.6 Diseño experimental y Análisis estadístico**

La evaluación de la actividad antifúngica de *K. cowanii* Ch1 y los COV's contra *S. rolfsii*, fue al azar y se realizó por triplicado para cada tratamiento. Los datos generados del porcentaje de inhibición se analizaron mediante el software DPS V12.01 para el análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p = 0.05$ ) para identificar diferencias específicas entre pares de medias.

## 6. Resultados

### 6.1 Efecto de los compuestos orgánicos volátiles (COV's) y *Kosakonia cowanii* Ch1 en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*

Como parte de su metabolismo, *K. cowanii* Ch1 produce compuestos orgánicos volátiles (COV's) con capacidad antifúngica. Para evaluar su efecto sobre *S. rolfsii*, se realizaron ensayos de interacción *in vitro* en el sistema de placas intercaladas. En primer lugar, se evaluó el efecto de los COV's de *K. cowanii* Ch1 sobre el crecimiento micelial de *S. rolfsii* sin contacto físico directo entre ambos organismos. A las 72 h, se observó una inhibición significativa del crecimiento del hongo, con una tasa promedio de reducción del  $80 \pm 5 \%$  en comparación con el control (Figura 6 A-B;  $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se examinó si *K. cowanii* Ch1 podía competir directamente contra *S. rolfsii* en condiciones de contacto físico. En ausencia de COV's, la bacteria fue sobrepasada por el micelio del hongo, sin que se observara un efecto de inhibición aparente (Figura 6C). Sin embargo, cuando la interacción física se realizó en presencia simultánea de los COV's emitidos por *K. cowanii* Ch1, el resultado fue notablemente distinto: no solo se afectó el crecimiento micelial del hongo, sino que además la colonia bacteriana presentó un cambio fenotípico visible, caracterizado por la formación de burbujas de gas sobre la superficie del medio (Figura 6D).

Este fenotipo no se manifestó cuando *K. cowanii* Ch1 fue expuesta únicamente a sus propios COV's en ausencia del hongo (Figura 6E), lo que sugiere que la formación de burbujas responde a una señal de interacción específica entre ambos microorganismos.

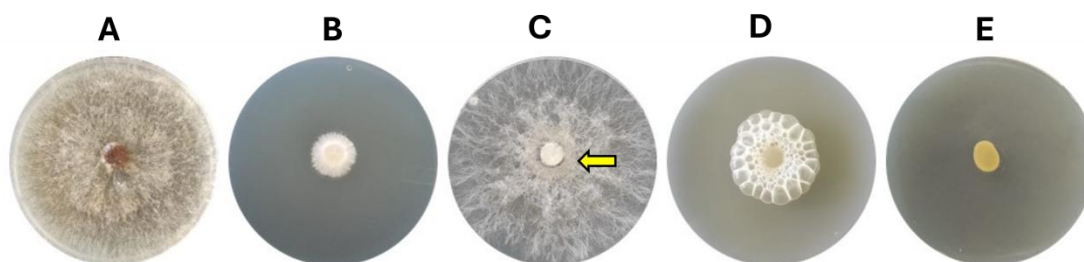


Figura 6. Ensayos de interacción microbiana. *Sclerotium rolfsii* creció en medio PDA como control (A) y en presencia de los COV's bacterianos, donde se observó una inhibición del crecimiento micelial (B). *Kosakonia cowanii* Ch1 se cultivó alrededor del disco micelial en ausencia (C) y en presencia (D) de sus propios COV's. La flecha en (C) indica cómo *S. rolfsii* sobrecreció la colonia bacteriana en ausencia de COV's, mientras que en presencia de COV's se observaron burbujas de gas producidas por *K. cowanii* Ch1. Como control adicional, se cultivó la bacteria únicamente en presencia de COV's (E). Las imágenes se registraron a las 72 h.

## 6.2. Análisis del transcriptoma de *Kosakonia cowanii* Ch1 durante la interacción con COV's y *Sclerotium rolfsii*

Una vez se conoció la respuesta de *K. cowanii* Ch1 en su interacción con los COV's y su efecto en la inhibición de *S. rolfsii* in vitro, se buscó evaluar si esta interacción, no solo genera un cambio fenotípico en la bacteria, sino también un cambio significativo en su expresión genética. Para ello, se realizó un análisis transcriptómico con el objetivo de identificar los genes y rutas metabólicas que podrían estar involucradas en la inhibición del crecimiento del hongo.

### 6.2.1 Extracción de RNA

Para el análisis transcriptómico, se extrajo por duplicado ARN de cultivos de *K. cowanii* Ch1 bajo diferentes condiciones experimentales: (1) en exposición a sus propios COV's, (2) en interacción directa con *S. rolfsii* en presencia de COV's y (3) control. La recolección de muestras se llevó a cabo a las 36 h de iniciado cada experimento, momento en el que *K. cowanii* Ch1 comienza a mostrar los cambios

fenotípicos característicos asociados a la competencia con *S. rolfsii*, incluyendo la formación de estructuras en forma de burbujas.

La elección de este tiempo de recolección se fundamenta en los resultados observados en los experimentos *in vitro*, donde se observa un cambio fenotípico en *K. cowanii* Ch1, detectando así las posibles alteraciones en la expresión genética de la bacteria y evaluar si estos compuestos promueven mecanismos de regulación asociados a su capacidad competitiva contra *S. rolfsii*.

### 6.2.2 Integridad y concentración de RNA

Las concentraciones, pureza, cantidad total e integridad del ARN extraído de *K. cowanii* Ch1 en los diferentes tratamientos se resumen en el Cuadro 3. Los análisis de concentración y pureza se realizaron mediante Nanodrop, mientras que la integridad fue evaluada mediante TapeStation (Figura 7).

Cuadro 3. Parámetros de concentración, pureza e integridad del ARN en *K. cowanii* Ch1 en los distintos tratamientos.

Muestra	Conc (ng/ µl)	260/280	260/230	Volumen después de QC	Cantidad total ARN (ng)
Control_kosakonia_1	110.3	2.05	1.84	27	2978.1
Control_kosakonia_2	47.8	2.04	1.48	27	1290.6
Tratamiento_kosakonia_1	123	2.04	1.8	27	3321
Tratamiento_kosakonia_2	79	2.02	1.78	27	2133
Tratamiento_kosakonia_VOCS_1	109.4	2.09	2.01	27	2953.8
Tratamiento_kosakonia_VOCS_2	52.4	2.06	1.92	27	1414.8

En los tratamientos donde *K. cowanii* Ch1 interactuó directamente con *S. rolfsii* (H1 y A2), las concentraciones de ARN alcanzaron 123 ng/μl y 79 ng/μl, respectivamente. Los valores de pureza fueron adecuados, con relaciones 260/280 cercanas a 2.0 y relaciones 260/230 entre 1.77 y 1.78. Los valores de integridad del ARN (RINe) fueron de 7.4 y 8.2, lo que indica una calidad suficiente para análisis transcriptómicos (Figura 7).

En las muestras expuestas tanto a los COV's como a *S. rolfsii* (B2 y C2), las concentraciones de ARN fueron de 109,4 ng/μl y 52,4 ng/μl. Las relaciones de absorbancia 260/280 oscilaron entre 2.06 y 2.09, mientras que la relación 260/230 fue de 2.01 y 1.92, reflejando pureza aceptable. Los valores RINe fueron de 8.9 y 8.5, lo que confirma la alta calidad del ARN obtenido.

En comparación, los controles de *K. cowanii* Ch1 (F1 y G1) presentaron concentraciones más bajas de ARN, con 110.3 ng/μl y 47.8 ng/μl. La muestra F1 mostró una integridad adecuada con un valor RINe de 8.5, mientras que la muestra G1 presentó un RINe de 7.7, ligeramente inferior pero aceptable. La pureza de ambas muestras fue adecuada, aunque la relación 260/230 de la muestra G1 (1.48) fue ligeramente inferior al valor ideal.

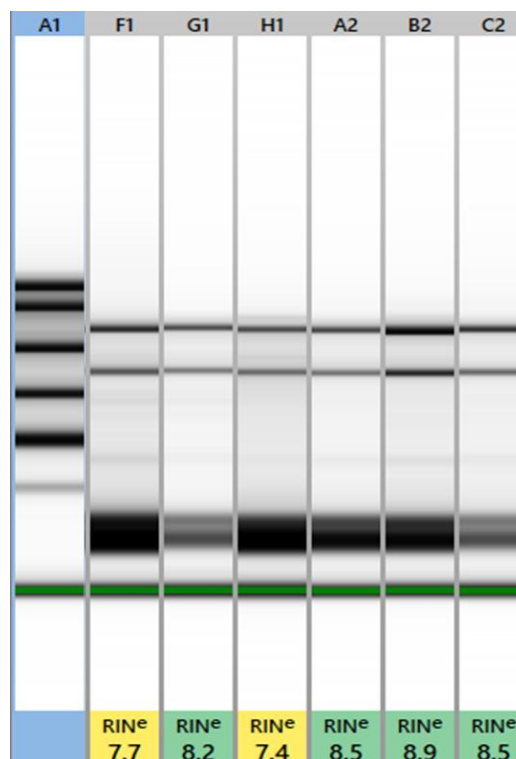


Figura 7. Perfil de integridad del ARN en muestras de *K. cowanii* Ch1 bajo diferentes condiciones experimentales. Los códigos técnicos (F1, G1, H1, A2, B2, C2) fueron asignados automáticamente por el sistema TapeStation y corresponden a los duplicados de los tratamientos descritos en el Cuadro 3: Control (F1, G1), *K. cowanii* + *S. rolfsii* (H1, A2) y *K. cowanii* + COV's + *S. rolfsii* (B2, C2).

### 6.2.3 Estadísticas generales de los datos de RNA-seq.

Se generaron seis bibliotecas de RNA-Seq a partir de muestras de *K. cowanii* Ch1 evaluando parámetros de calidad, alineamiento y asignación de lecturas (Cuadro 4). Se obtuvieron entre 42.3 y 52.7 millones de secuencias por muestra, con un contenido GC entre 45 % y 53 %. El 98 % de las lecturas pasaron los filtros de calidad, con una baja proporción de ARN ribosomal (menor al 3.6 %), indicando una concentración adecuada de ARN mensajero. El porcentaje de alineamiento varió entre condiciones, siendo menor en los tratamientos sin COV's (24.3 % - 44.2 %) y más alto en los tratamientos con COV's y controles (mayor a 86 %). A pesar de estas diferencias, el número total de genes detectados fue consistente en todas

las muestras (~4440 genes), lo que sugiere que la expresión global del transcriptoma se mantiene estable.

Cuadro 4. Estadísticas generales de las lecturas de RNA-seq para los distintos tratamientos.

Nombre de la muestra	M Seqs	% GC	% Alinea	% Dups	% rRNA	Número de genes detectados
Tratamiento_kosakonia_1_TK1	52.7	45%	24.30%	63.90%	3.59%	4434
Tratamiento_kosakonia_2_TK2	46.1	50%	44.20%	65.30%	3.37%	4438
Tratamiento_kosakonia_VOCS_1_TKV1	48.7	53%	93.00%	61.00%	2.69%	4446
Treatmento_kosakonia_VOCS_2_TKV2	42.3	53%	86.70%	61.80%	3.08%	4440
Control_kosakonia_1_CK1	48.4	53%	96.00%	68.00%	3.04%	4444
Control_kosakonia_2_CK2	47	53%	98.90%	66.90%	2.65%	4443

#### 6.2.4 Evaluación de calidad de secuencias

La calidad de las secuencias obtenidas en los análisis de RNA-Seq se evaluó utilizando FastQC y resumiéndolo en MultiQC. Los valores de calidad promedio (Phred Score) fueron superiores a 39 a lo largo de todas las secuencias (Figura 8), lo que indica una alta calidad en la secuenciación.



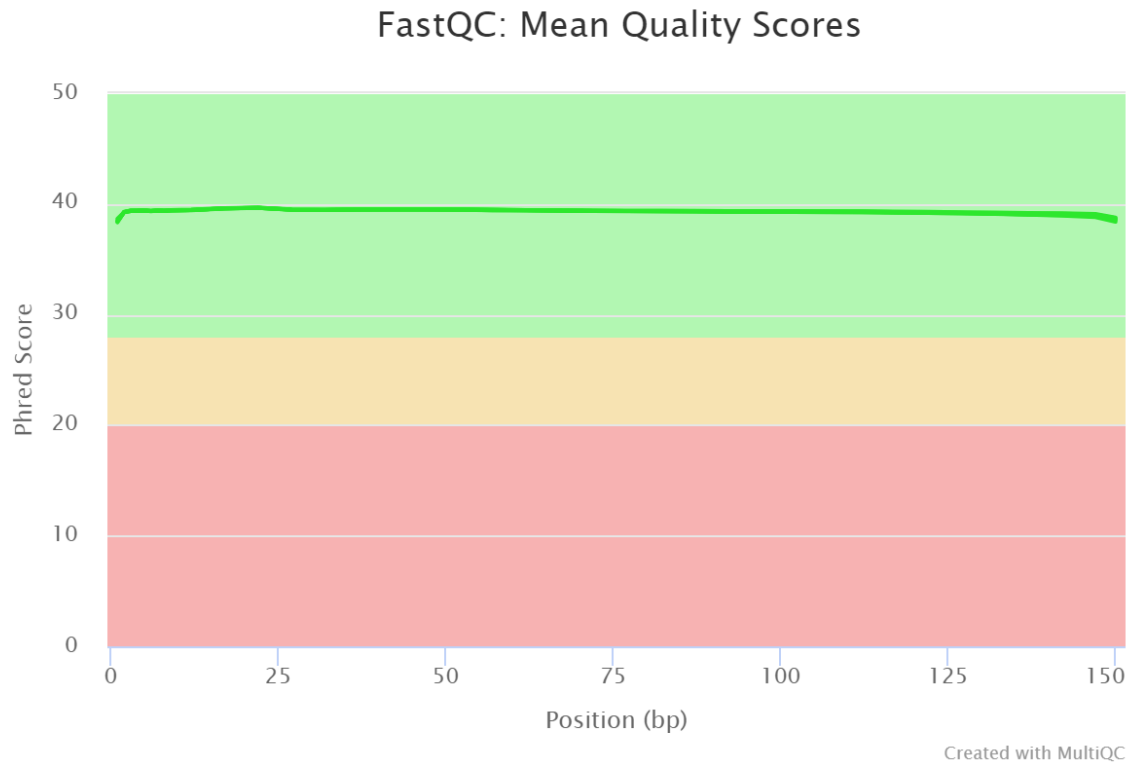


Figura 8. Calidad promedio de las lecturas de RNA-Seq, evaluada mediante FastQC.

El contenido de guanina y citosina (GC) se mantuvo entre 45 % y 53 %, y no se observaron sesgos significativos en la composición de bases a lo largo de las lecturas. Así mismo, el análisis de secuencias sobrerrepresentadas mostró que no se detectaron adaptadores ni contaminantes en proporciones considerables, lo que confirma un adecuado proceso de preparación de bibliotecas y remoción de adaptadores antes del alineamiento. Estos resultados indican que las lecturas obtenidas presentan una alta calidad y confiabilidad, lo que permitió continuar con su uso en los análisis posteriores de alineamiento y expresión genética diferencial.

### 6.2.5 Alineamiento y mapeo de lecturas

Las lecturas obtenidas fueron alineadas al genoma de referencia de *K. cowanii* Ch1 utilizando el software STAR. Se observaron diferencias en el porcentaje de lecturas alineadas entre los tratamientos evaluados (Figura 9).

En los tratamientos sin COV's (TK1 y TK2), el porcentaje de lecturas alineadas fue bajo (24.3 % y 44.2 %), con una alta proporción de lecturas no alineadas (50.0 % - 35.0 %) debido a múltiples desajustes o fragmentos demasiado cortos. En contraste, los tratamientos con COV's (TKV1 y TKV2) y los controles (CK1 y CK2) presentaron un porcentaje de alineamiento significativamente mayor (93.0 % - 98.9 %), con una mínima proporción de lecturas no alineadas ( $\leq 3.0$  %).

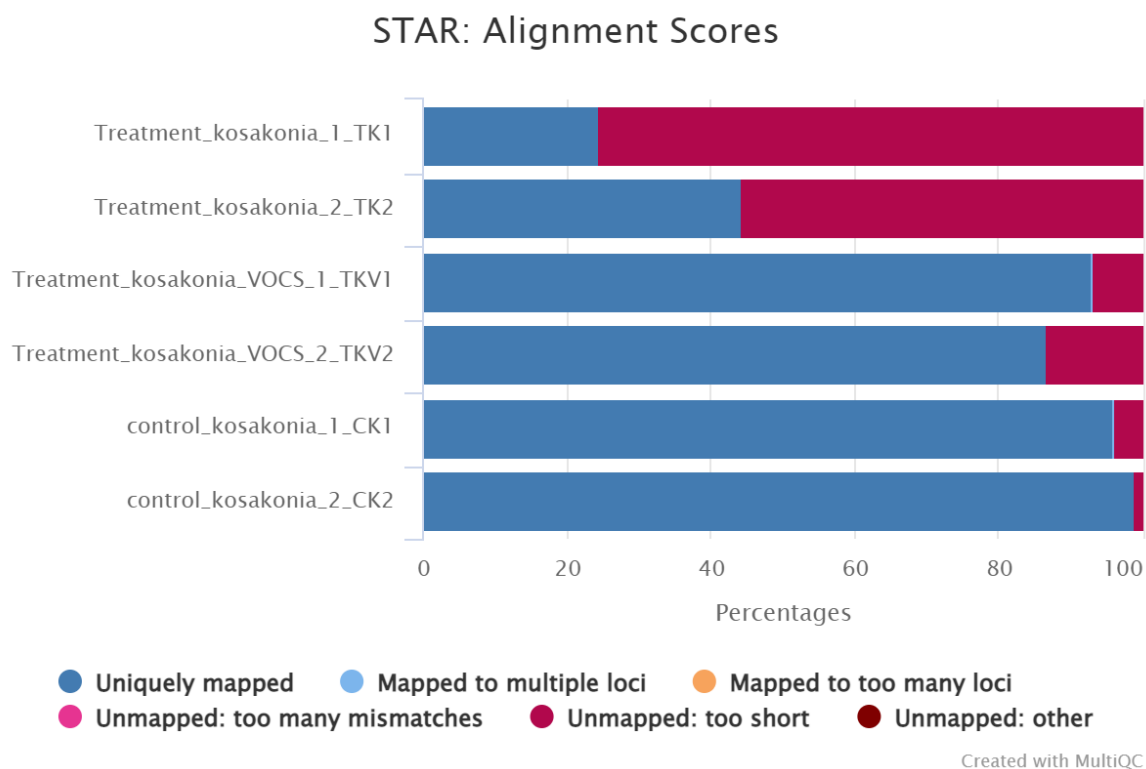
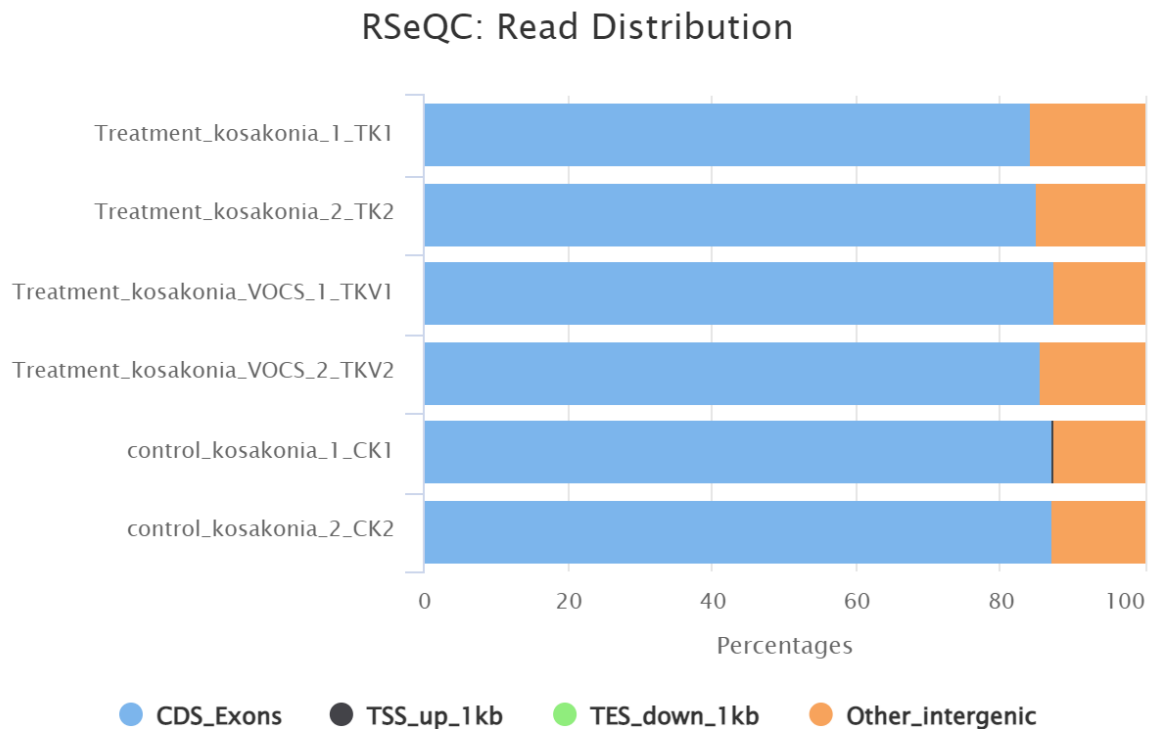


Figura 9. Porcentaje de alineamiento de lecturas en los distintos tratamientos.

### 6.2.6 Distribución de lecturas y clasificación de tipos de ARN

Para evaluar la calidad del alineamiento y la cobertura del transcriptoma en los distintos tratamientos, se analizó la distribución de lecturas en el genoma (Figura 10). Se observó que la mayoría de las lecturas se asignaron a exones codificantes (CDS Exons) en todas las muestras, con una menor proporción en regiones intergénicas. Esta distribución fue consistente entre los tratamientos, lo que sugiere que el alineamiento y la captura de información transcriptómica fueron adecuados en todas las condiciones evaluadas.



Created with MultiQC

Figura 10. Distribución de las lecturas en las distintas regiones del genoma. La mayoría de las lecturas se alinearon en exones codificantes (CDS Exons), con una proporción menor en regiones intergénicas.

Por otro lado, para caracterizar los perfiles transcriptómicos en los distintos tratamientos, se clasificaron las lecturas de RNA-Seq en diferentes biotipos de ARN utilizando featureCounts. La mayoría de las lecturas se asignaron a transcritos codificantes de proteínas ("protein-coding"), lo que indica una captura efectiva de genes con función estructural o metabólica en *K. cowanii* Ch1.

Además, se detectaron fracciones menores de otros biotipos de ARN, como ARN ribosomal (rRNA) y ARN no codificante, en proporciones esperadas para un análisis transcriptómico bacteriano. La baja presencia de ARNr confirma que la estrategia de remoción de ARN ribosomal fue eficiente, permitiendo una mejor representación de los transcritos codificantes en el análisis.

No se observaron diferencias significativas en la proporción de biotipos entre los tratamientos, lo que indica que la calidad y composición del transcriptoma fue consistente en todas las condiciones evaluadas (Figura 11).

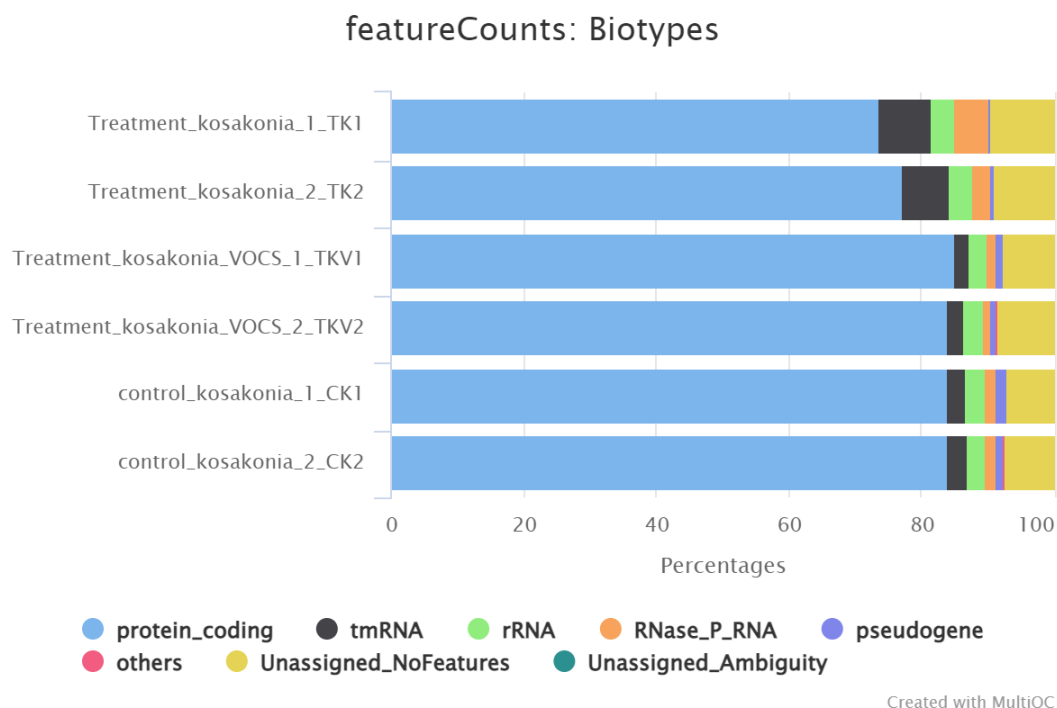


Figura 11. Distribución de los biotipos de ARN en las muestras analizadas. La mayoría de las lecturas corresponden a transcritos codificantes de proteínas, con fracciones menores de otros biotipos, incluyendo ARN ribosomal y ARN no codificante.

### 6.2.7 Distancia y similitud entre muestras

Para evaluar la similitud entre las muestras en función de sus perfiles transcriptómicos, se generó una matriz de correlación de Pearson a partir de los datos de expresión génica normalizados (Figura 12). Los valores de correlación reflejan el grado de similitud entre las muestras, donde valores cercanos a 1 indican una mayor similitud.

Para reducir el ruido técnico y mejorar la interpretación de los datos, se aplicó una transformación rlog (regularized log transformation) en DESeq2 antes del cálculo de la correlación. Se observa que algunas muestras presentan una alta correlación entre sí, mientras que otras muestran valores más bajos, reflejando diferencias en sus perfiles de expresión génica.

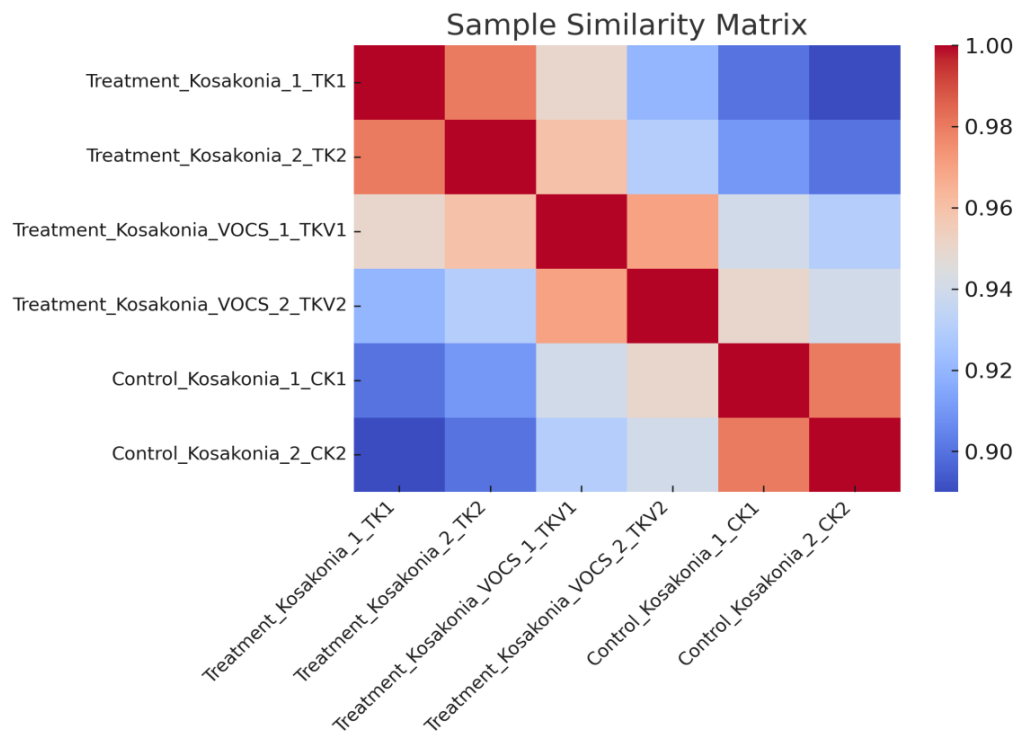


Figura 12. Matriz de similitud de muestras basada en la correlación de Pearson. Los colores representan el coeficiente de correlación, donde valores más cercanos a 1 indican mayor similitud entre muestras.

### 6.3 Expresión genética diferencial

Para evaluar los cambios en la expresión génica en respuesta a los tratamientos, se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando DESeq2, con un criterio de significancia de  $p_{adj} < 0.05$ . Se identificaron genes diferencialmente expresados en ambas comparaciones experimentales.

En la comparación del Tratamiento de *K. cowanii* Ch1, se identificaron 388 genes sobreexpresados y 269 genes reprimidos en relación con el grupo control. Un total de 3,796 genes no mostraron cambios significativos en su expresión.

Por otro lado, en el Tratamiento *K. cowanii* Ch1+ COV's, se identificaron 35 genes sobreexpresados y 4 genes reprimidos en comparación con el grupo control. Un total de 4,414 genes no presentaron cambios significativos en su expresión (Figura 13).

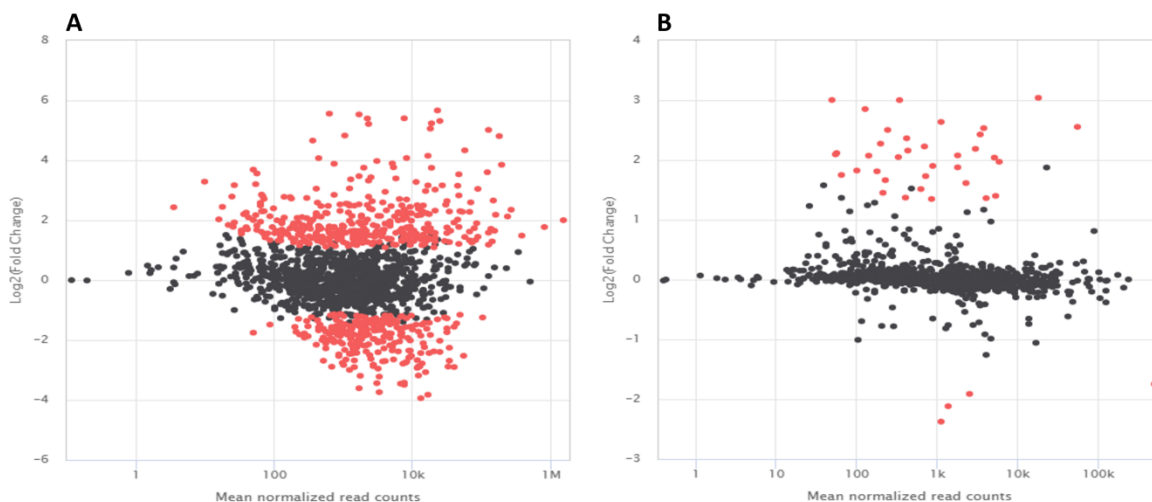


Figura 13. Visualización tipo MA de la expresión génica diferencial en *K. cowanii* Ch1. Representación de genes diferencialmente expresados en comparaciones pareadas durante la interacción bacteria-hongo en ausencia (A) y presencia (B) de compuestos orgánicos volátiles (COV's). Ambas condiciones fueron comparadas contra el control, donde *K. cowanii* Ch1 creció sin exposición a COV's. El eje X muestra los niveles de expresión (media logarítmica normalizada) y el eje Y indica los valores de log2 del cambio de expresión (fold change). Los puntos rojos corresponden a genes diferencialmente expresados con valores ajustados de  $p < 0.05$ , mientras que los puntos negros representan genes sin cambios significativos. La contracción del tamaño del efecto fue realizada utilizando el método 'ashr' implementado en DESeq2.

### 6.3.1 Genes expresados diferencialmente en *K. cowanii* Ch1 en presencia de *S. rolfesii*

De acuerdo con los genes diferencialmente sobreexpresados en *K. cowanii* Ch1, se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO), y las principales rutas enriquecidas se presentan en la Figura 14A. Durante la interacción microbiana con *S. rolfesii*, se identificaron un total de 19 rutas principales, con una cantidad significativa de genes asociados a respuestas al estrés, lo que sugiere que *K. cowanii* Ch1 estuvo bajo condiciones de estrés considerable en respuesta a la cepa fúngica.

Se identificaron reguladores transcripcionales clave, incluyendo *yqjI*, que presentó una sobreexpresión superior a cuatro veces y está asociado con la homeostasis del hierro. Además, el gen *feoC*, relacionado con la importación de hierro ferroso [Fe (II)], mostró una sobreexpresión de dos veces. Reguladores transcripcionales sensibles al estrés oxidativo como *soxRS* y *qorR* estuvieron sobreexpresados en más de 1.5 veces, indicando la activación de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. De manera similar, *phoP* presentó una sobreexpresión superior a dos veces, desempeñando un papel crucial en la virulencia, homeostasis del magnesio y resistencia a agentes antimicrobianos, incluyendo pH ácido y péptidos antimicrobianos catiónicos. El gen *zntR*, que controla la homeostasis celular de Zn (II), también estuvo sobreexpresado dos veces.

Se detectaron otros reguladores transcripcionales adicionales sobreexpresados dos veces, como *ydcl*, un regulador de la familia LysR involucrado en la homeostasis del pH; *norR*, que codifica una proteína reguladora dependiente de  $\sigma^{54}$  que detecta óxido nítrico para activar genes de desintoxicación; y *creB*, un regulador de un sistema de transducción de señales de dos componentes involucrado en el metabolismo intermediario. Además, se identificó la sobreexpresión del regulador de la familia LysR *yeiE*, vinculado a la motilidad mediada por flagelos y sobreexpresado más de 1.5 veces, y *slyA*, un regulador de

la respuesta al estrés y virulencia con una sobreexpresión de 2.5 veces. Notablemente, el gen *iscR*, responsable de detectar los niveles celulares de [Fe-S] y regular la homeostasis de estos clústeres bajo estrés, también estuvo significativamente sobreexpresado.

Se enriquecieron varias rutas asociadas a la adquisición de hierro y la defensa contra el estrés oxidativo. Por ejemplo, los genes de transporte de hierro mediado por sideróforos, incluyendo *entCF*, que codifica enzimas para la biosíntesis de enterobactina, estuvieron sobreexpresados más de 1.5 veces. Además, los genes relacionados con el transporte de enterobactina, como *fepBCD*, *tonB*, *exbBD* y *fes*, mostraron un aumento en su expresión. También se observaron niveles elevados en los genes de transporte de hierro ferroso como *feoAB*. Entre los genes de defensa contra el estrés oxidativo, se encontraron significativamente sobreexpresados (>1.5 veces) *fhuF* (reductasa férrica), *ahpC* (proteína reductasa de hidroperóxido de alquilo), *gapA* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD), *msrA* (reductasa de metionina en péptidos), *nrdG* (ribonucleótido reductasa de clase III), *tpx* (peroxidasa de tiol) y QU629\_RS03245 (oxidoreductasa).

También se identificaron genes con una sobreexpresión mayor a 1.5 veces involucrados en la prevención del mal plegamiento y la agregación de proteínas, como *bhsA* (proteína de resistencia a estrés múltiple), *ibpAB* (proteínas pequeñas de choque térmico), *grpE* (proteína de choque térmico), *clpB* (chaperona ATP-dependiente), *dnaJK* (proteínas chaperonas), *groL* (chaperona de la familia de 60 kDa) y *degP* (proteasa/chaperona HtrA). Además, se enriquecieron rutas relacionadas con la desintoxicación de oxidantes celulares y el metabolismo del glutatión, con genes como *gstA* (glutatión S-transferasa), *trxC* (tioredoxina 2) y *nrdH* (proteína similar a glutarredoxina) mostrando un incremento en su expresión.

Asimismo, se identificaron genes adicionales con altos niveles de sobreexpresión en este análisis, incluyendo QU629\_RS16930 (2-oxobutirato oxidasa, asociado con



el metabolismo oxidativo), *fhuF* (reductasa férrica, involucrada en el metabolismo del hierro) y *ahpC* (reductasa de hidroperóxido de alquilo, con un papel clave en la defensa contra el estrés oxidativo).

Otros genes de interés sobreexpresados incluyen *msrA* (reductasa de metionina en péptidos, asociada con la reparación de proteínas bajo estrés oxidativo), *nrdG* (ribonucleótido reductasa anaeróbica, crucial para la síntesis de ADN en condiciones de estrés) y *gntX*, un gen relacionado con la competencia bacteriana y la adquisición de ADN, lo que sugiere un posible mecanismo de adaptación de *K. cowanii* Ch1 durante la interacción con *S. rolfsii*. Se detectaron otros genes sobreexpresados relacionados con transportadores importantes, proteínas de membrana, motilidad, regulación de señales, resistencia a antibióticos y metabolismo.

Por otro lado, de acuerdo con los genes diferencialmente reprimidos en *K. cowanii* Ch1, se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO), y las principales rutas afectadas se presentan en la Figura 14B. Durante la interacción microbiana con *S. rolfsii*, se identificaron varias rutas significativamente reprimidas, relacionadas con el metabolismo de fosfatos, el transporte de aminoácidos, la biosíntesis de la pared celular y la regulación del metabolismo secundario.

Entre los genes con mayor represión se encuentra *phnF* (-4.03 veces), un regulador transcripcional clave involucrado en la utilización de fosfonatos como fuente de fósforo. De manera similar, el gen *phnH* (-3.73 veces), relacionado con la degradación de compuestos fosforados orgánicos, presentó una represión significativa. También se observó la represión del gen *phnI* (-3.56 veces), que codifica una permeasa del sistema de transporte de fosfonatos.

Otro gen altamente reprimido fue *ytfQ* (-3.87 veces), que codifica una proteína transportadora ABC involucrada en la captación de galactofuranosa. Además, *ytfE* (-3.49 veces), una proteína asociada con la reparación de proteínas dañadas por el estrés oxidativo, presentó una disminución en su expresión. *glnH* (-3.21 veces), un

gen que codifica una proteína transportadora de glutamina, mostró una reducción en su expresión, lo que indica una posible afectación en la regulación del metabolismo del nitrógeno.

El metabolismo de compuestos azufrados también se vio afectado, como lo indica la represión del gen QU629\_RS00010 (-3.92 veces), que codifica una sulfurtransferasa. De manera adicional, *cysW* (-3.45 veces), un gen involucrado en el transporte de cisteína, mostró una reducción en su expresión.

Así mismo, se observó una represión en genes relacionados con la degradación de compuestos aromáticos y metabolismo secundario, como QU629\_RS04710 (-4.00 veces), que codifica una 4,5-DOPA dioxigenasa extradiol. También se identificó la represión de *pcaJ* (-3.28 veces), que participa en la ruta del protocatecuato en la degradación de compuestos aromáticos. *hpaX* (-3.14 veces), involucrado en el transporte de hidroxifenilacetato, también mostró una reducción en su expresión.

Otros genes reprimidos incluyen *opuCA* (-3.40 veces), un gen relacionado con el transporte de osmoprotectoras, y *dppA* (-3.32 veces), que codifica una proteína transportadora de péptidos di/tripeptídicos. También se observó la represión de *ABC* transporter permease (-3.38 veces), implicado en la captación de nutrientes esenciales. Los detalles completos de los genes diferencialmente expresados durante la interacción de *K. cowanii* Ch1 con *S. rolfsii* se presentan en el Anexo 1.

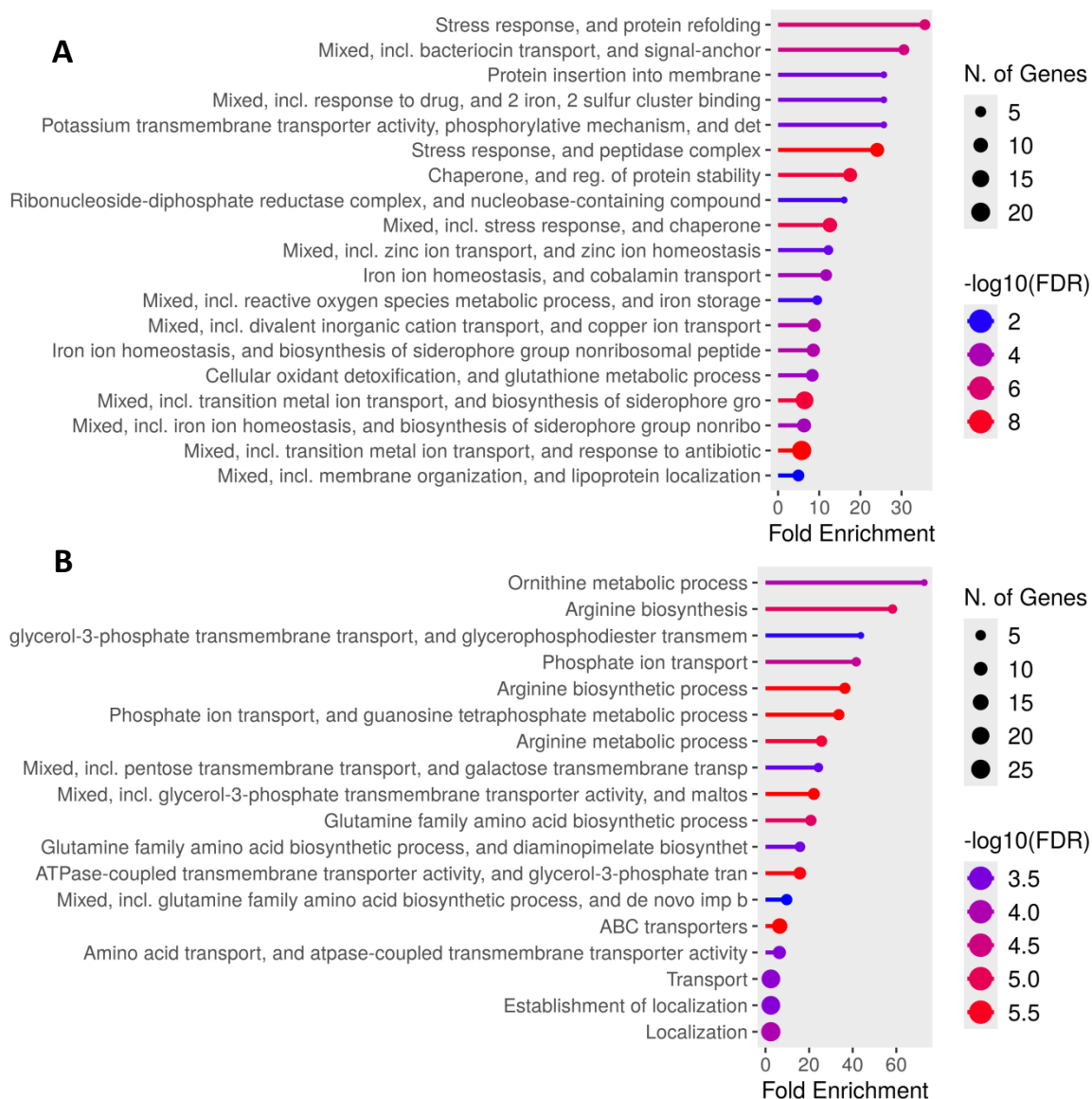


Figura 14. Enriquecimiento de ontología génica (GO) en *K. cowanii* Ch1 durante la interacción con *S. rolfssii*. Análisis de las rutas enriquecidas a partir de genes diferencialmente expresados en ausencia de compuestos orgánicos volátiles (COV's), bajo interacción directa con *S. rolfssii*. (A) Procesos enriquecidos a partir de genes sobreexpresados. (B) Procesos enriquecidos a partir de genes reprimidos. Se consideraron genes con  $\log_2$  (fold change)  $> 1.0$  o  $< -1.0$ , con valores de FDR  $< 0.05$ . Las rutas se identificaron mediante el análisis de clústeres locales en la base de datos STRING

### 6.3.2 Genes expresados diferencialmente en *K. cowanii* Ch1 en presencia de *S. rolfsii* y COV's

Basándose en el fenotipo observado de *K. cowanii* Ch1 en presencia de COV's particularmente la característica formación burbujas (Figura 6D), el análisis transcriptómico (RNA-seq) reveló la regulación diferencial de múltiples genes durante esta interacción de competencia microbiana. En total, se identificaron 19 rutas principales afectadas (Figura 15A).

Uno de los genes más destacados fue *katG*, que codifica una catalasa y mostró una sobreexpresión de 2.7 veces. Esta enzima está relacionada con la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Esto indicó una activación del sistema antioxidante bacteriano como mecanismo defensivo. Además de *katG*, se observaron otros genes asociados a defensa frente al estrés oxidativo como *ahpC* (3.1 veces), *gapA* (2.8 veces), *msrA* (2.3 veces), *tpx* (2.4 veces) y QU629\_RS03245 (2.0 veces).

El análisis de enriquecimiento funcional (GO) indicó que varias rutas metabólicas clave estuvieron asociadas a los genes sobreexpresados. Entre ellas, se destacaron procesos relacionados con la biosíntesis y el transporte de sideróforos, incluyendo actividades de ensamblaje de enterobactina y proteínas del complejo sintetasa. Se identificó la sobreexpresión de genes como *entS*, *entCF*, *fepBDG*, *tonB*, *exbBD* y *fes*, que forman parte del sistema de transporte de hierro mediado por sideróforos, todos con aumentos mayores a 1.0 veces. A esto se suman los genes *feoAB* y *efeOU*, correspondientes al sistema de transporte de hierro ferroso, también sobreexpresados en esta condición.

El sistema *znuABC*, encargado del transporte y homeostasis de iones de zinc, también mostró un patrón de sobreexpresión (>1.0 veces). En cuanto al mantenimiento de la integridad proteica, se detectó la inducción de *ibpAB* (proteínas de choque térmico de 16 kDa), así como otras chaperonas como *grpE*, *clpB*, *dnaJK*,

*groL* y *degP*, todas con sobreexpresión >1.5 veces, relacionadas con el plegamiento y la protección de proteínas bajo condiciones de estrés.

También se identificaron genes relacionados con la estructura flagelar, incluyendo *flhACD*, *flgCDEFGHI* y *filFN*, lo que podría estar vinculado a una modulación de la motilidad como parte de la respuesta de adaptación a los COV's.

Además, se observaron genes con funciones potencialmente antimicrobianas, como una monooxigenasa implicada en la biosíntesis de antibióticos (QU629\_RS21570), que mostró una sobreexpresión de 2.1 veces, y módulos relacionados con policétido sintasa (QU629\_RS05045), con un aumento de 1.7 veces. El enriquecimiento funcional también destacó rutas vinculadas con la biosíntesis de ácidos grasos, procesos catabólicos de azúcares como L-arabinosa y ramnosa, y transporte de ácidos monocarboxílicos, reflejando posibles ajustes metabólicos para sostener el crecimiento bajo condiciones adversas.

Finalmente, se detectaron genes relacionados con proteínas de membrana, regulación de señales y metabolismo general, lo que sugiere una respuesta coordinada y multifactorial de *K. cowanii* Ch1. En cuanto a los genes reprimidos bajo esta misma condición, destacan QU629\_RS14550, que codifica una AMP nucleosidasa (-3.40 veces), QU629\_RS06260, una proteína tipo RcnR posiblemente relacionada con el transporte de metales (-2.51 veces), y QU629\_RS09495, una metiltransferasa de uridina en tRNA (-2.40 veces).

También se encontró represión en genes como QU629\_RS19845 (una fosfodiesterasa) y QU629\_RS20060 (una proteína de membrana UPF0060), con valores de -2.39 y -2.32 veces, respectivamente. Debido al número limitado de genes reprimidos, el análisis de GO arrojó pocas categorías significativas, entre ellas, una relacionada con la degradación de esteroides y pared de esporas, y otra vinculada a actividad oxidorreductasa poco caracterizada (Figura 15B). Los detalles completos de los genes diferencialmente expresados durante la interacción de *K.*

*cowanii* Ch1 con *S. rolfsii* en presencia de sus propios COV's se presentan en el Anexo 2.

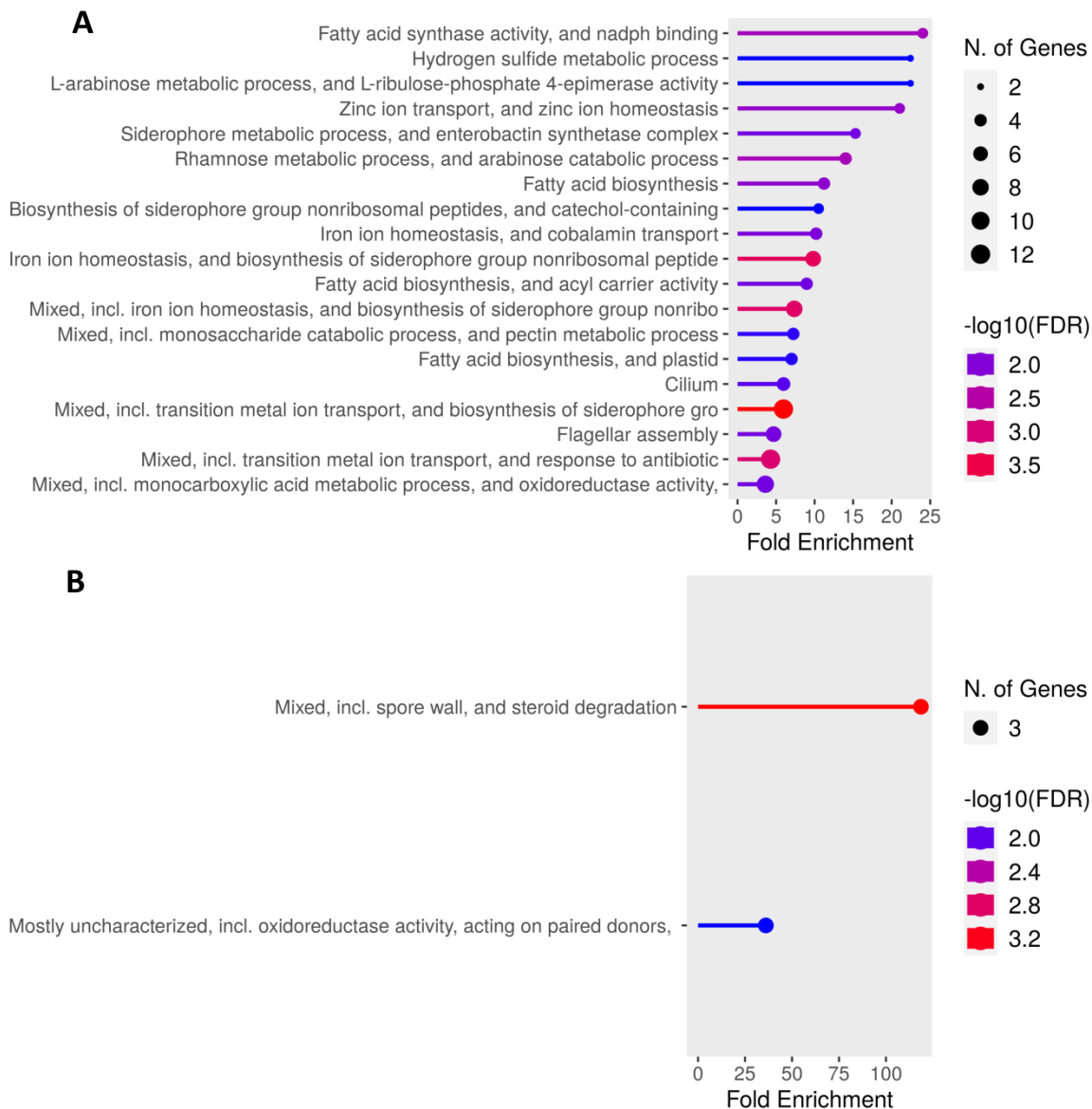


Figura 15. Enriquecimiento de ontología génica (GO) en *K. cowanii* Ch1 durante la interacción con *S. rolfsii* en presencia de COV's. Análisis de rutas enriquecidas a partir de genes diferencialmente expresados bajo interacción directa con *S. rolfsii* y exposición simultánea a compuestos orgánicos volátiles (COV's). (A) Procesos enriquecidos a partir de genes sobreexpresados. (B) Procesos enriquecidos a partir de genes reprimidos. Se consideraron genes con  $\log_2$  (fold change)  $> 1.0$  o  $< -1.0$  y valores de FDR  $< 0.05$ . Las rutas fueron identificadas mediante agrupamiento de redes locales en la base de datos STRING.

## 7. Discusión

### **Efecto de los compuestos volátiles (COV's) y *Kosakonia cowanii* Ch1 en la interacción con *Sclerotium rolfsii***

Los ensayos en cajas mostraron el efecto antifúngico de los COV's producidos por *K. cowanii* Ch1 sobre *S. rolfsii*. Tras 72 horas de exposición, se registró un porcentaje de inhibición promedio del  $80 \pm 5 \%$ , un valor considerablemente alto si se compara con reportes previos. Por ejemplo, *Bacillus velezensis* LT1 logró inhibiciones de 81.67 % y 80.08 % sobre *S. rolfsii*, pero al aplicar los compuestos individuales purificados como la 2-dodecanona y 2-undecanona (Tang *et al.*, 2024). En contraste, el presente estudio se basó en la acción en conjunto de los COV's producidos por la cepa Ch1, donde se empleó la mezcla total de volátiles emitidos naturalmente por *K. cowanii* Ch1. Lo cual sugiere que la combinación de los compuestos podría tener un efecto comparable o incluso superior en eficacia antifúngica. Además, un estudio previo con otra cepa de *K. cowanii* (Cp1) reportaron una inhibición del 52.79 % sobre *S. rolfsii* (Hernández-Flores *et al.*, 2023).

En estas condiciones, *S. rolfsii* presentó una disminución en su crecimiento micelial, lo cual podría estar relacionado con daños celulares indirectos causados por la acción de los COV's. Se ha reportado que algunos de los compuestos volátiles producidos por *K. cowanii* Ch1, como alcoholes, aldehídos, cetonas y pirazinas, pueden afectar la integridad estructural de hongos fitopatógenos, al alterar la permeabilidad de las membranas, inducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e interferir con rutas metabólicas esenciales (Zhao *et al.*, 2022). Estos efectos combinados pueden llevar al hongo a un estado de estrés fisiológico severo, comprometiendo tanto su crecimiento como su viabilidad celular. En este contexto, es posible que los volátiles de la cepa Ch1 actúen mediante mecanismos similares.

Por otro lado, cuando ambos organismos se cultivaron en contacto directo, pero sin permitir la difusión de COV's, el hongo creció sin restricciones y terminó sobrepasando a la bacteria. Este resultado sugiere que *K. cowanii* Ch1 por sí sola, no posee la capacidad competitiva suficiente para inhibir el desarrollo fúngico de *S. rolfsii*. Sin embargo, los resultados más interesantes se obtuvieron cuando se combinaron ambas condiciones: la presencia directa de *K. cowanii* Ch1 y la exposición simultánea de COV's frente a *S. rolfsii* dentro del sistema de cajas. Bajo esta condición, se observó una inhibición total del crecimiento del hongo (100 %). Además, la aparición de un fenotipo totalmente distinto a lo observado en los otros tratamientos: la formación de burbujas de gas generadas por *K. cowanii* Ch1 en el entorno inmediato del micelio fúngico.

Este fenotipo específico no se presentó en el tratamiento donde *K. cowanii* Ch1 fue expuesta únicamente a sus propios COV's, lo cual indica que la producción de burbujas no es una respuesta basal de la bacteria, sino una manifestación asociada a la interacción directa con *S. rolfsii* bajo condiciones de estrés compartido. En este contexto, los COV's podrían estar provocando un estado de estrés oxidativo en *S. rolfsii*, debilitando su fisiología y facilitando con ello la acción competitiva de *K. cowanii* Ch1.

Se ha reportado que *S. rolfsii* puede activar diversos mecanismos antioxidantes frente al estrés oxidativo, entre ellos se podría incluir la expresión de catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas, tal y como se reportó en su pariente cercano *Sclerotinia sclerotiorum*. Sin embargo, cuando la intensidad del estrés supera su capacidad de respuesta, pueden acumularse daños celulares que afectan no solo el crecimiento micelial y la viabilidad fúngica, sino también procesos clave como la diferenciación de esclerocios (Papapostolou *et al.*, 2014). Por lo tanto, la combinación de COV's y el contacto directo con *K. cowanii* Ch1 podría alterar de forma crítica el equilibrio redox del hongo, impidiendo su compensación fisiológica y desencadenando una inhibición total del crecimiento.



Además del efecto de inhibición sobre el hongo, esta interacción también parece impactar el metabolismo de *K. cowanii* Ch1. La aparición de burbujas de gas únicamente en el tratamiento combinado sugiere una activación de rutas metabólicas específicas que no se llegan a manifestar bajo condiciones individuales. Aunque este fenómeno no ha sido descrito explícitamente para *K. cowanii*, se ha documentado que ciertas bacterias pueden generar subproductos gaseosos como resultado de procesos fermentativos o respiratorios alterados, especialmente en contextos de competencia.

Entre estos compuestos se encuentran la acetoína y el 2,3-butanodiol, asociados con rutas fermentativas en diversas especies bacterianas (Kai *et al.*, 2006). Curiosamente, *K. cowanii* también ha sido reportada como productora de acetoína y otros compuestos volátiles con actividad antifúngica, como las pirazinas, durante interacciones competitivas (Hernández-Flores *et al.*, 2023; Mena Navarro *et al.*, 2024). Por lo tanto, la producción de burbujas observada podría estar relacionada con una reprogramación metabólica inducida por la interacción con *S. rolf sii* y sus propios COV's, derivando en la generación de subproductos de estas rutas activadas.

En conjunto, los resultados plantean un escenario competitivo altamente dinámico, donde ambas especies responden de manera activa. Los COV's no solo debilitan la fisiología de *S. rolf sii*, sino que al mismo tiempo parecen modular favorablemente la respuesta metabólica de *K. cowanii* Ch1, promoviendo su ventaja ecológica. Este tipo de dinámica ha sido descrita en otras interacciones microbianas mediadas por compuestos volátiles, en las que una misma señal química puede inhibir el desarrollo de un organismo mientras estimula procesos metabólicos beneficiosos en otro, incluyendo la producción de volátiles antimicrobianos y la reprogramación de rutas fisiológicas de forma especie-específica (Schmidt *et al.*, 2015).

**Genes diferencialmente expresados en *K. cowanii* Ch1 durante la competencia directa con *S. rolf sii*.**

Durante la interacción directa entre *K. cowanii* Ch1 y *S. rolfii*, en ausencia de COV's, se observó que el crecimiento micelial del hongo sobrepasó a la colonia bacteriana. Este resultado, previamente descrito en los ensayos *in vitro*, sugiere una condición de desventaja competitiva para *K. cowanii* Ch1, posiblemente asociada a factores como el estrés oxidativo, la competencia por nutrientes y la competencia por espacio. A fin de comprender los mecanismos moleculares implicados en esta interacción, se realizó un análisis transcriptómico que reveló una respuesta adaptativa compleja por parte de la bacteria. Los genes diferencialmente expresados indican la activación de rutas funcionales relacionadas con la adquisición de nutrientes, protección frente a daño proteico y estrés oxidativo, movilidad y producción de metabolitos secundarios. Esto sugiere que *K. cowanii* Ch1 respondió mediante una combinación multifactorial de mecanismos adaptativos para sostener su viabilidad frente a la presión ejercida por el crecimiento fúngico.

En condiciones de interacción microbiana, es común que se acumulen especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de alteraciones en la homeostasis redox celular, ya sea por secreciones de uno de los organismos o por desequilibrios metabólicos derivados de la competencia (Li *et al.*, 2021). En este contexto, se sabe que *S. rolfii* puede secretar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al medio como mecanismo de defensa, ya sea para limitar el crecimiento de bacterias competidoras o como parte de su desarrollo estructural (Sideri *et al.*, 2000). Esto sugiere que *K. cowanii* Ch1 se encuentra expuesta a un entorno oxidante incluso sin la presencia de compuestos adicionales.

En respuesta a estas condiciones, *K. cowanii* Ch1 activó un conjunto de sensores y reguladores transcripcionales enfocados en la detección de ROS, como lo demuestra la sobreexpresión de *soxR* y su regulador directo *soxS*. *SoxR* es un sensor redox que responde específicamente a la presencia de superóxidos mediante la oxidación de su centro  $[2Fe-2S]$ , desencadenando la expresión de *soxS*, un regulador global que activa una variedad de genes implicados en la

defensa frente al estrés oxidativo, la reparación del daño celular y la restauración del equilibrio redox (Seo *et al.*, 2015). En enterobacterias, se ha reportado que SoxS activa genes como *fpr*, *nfo*, *sodA*, *zwf*, *acnA*, *grxA* y *nrdG*, involucrados en el mantenimiento del equilibrio redox y la protección contra ROS (Imlay *et al.*, 2008).

Junto a estos sensores, *K. cowanii* Ch1 presentó una activación de genes antioxidantes adicionales, como *ahpC*, *tpx*, *msrA*, *gapA*, *nrdG*, *trxC*, *nrdH* y una oxidoreductasa (U629\_RS03245). La sobreexpresión de *ahpC* resulta especialmente relevante, ya que este gen forma parte del sistema peroxirredoxina que reduce hidroperóxidos a agua, utilizando como cofactor NADH. *ahpC* es típicamente regulado por *OxyR* y suele activarse en condiciones de bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Seixas *et al.*, 2022). Esto podría sugerir que el estrés oxidativo es moderado, ya que *K. cowanii* Ch1 está utilizando múltiples vías para manejar este tipo de estrés.

*MsrA*, por su parte, revierte la oxidación de residuos de metionina en proteínas, mientras que *trxC* (una tiorredoxina) contribuye a la restauración de proteínas dañadas por ROS (Imlay, 2013). La expresión de *gapA* (además de su función central en la glucólisis) ha sido relacionada con el control del flujo de NAD<sup>+</sup>/NADH y la generación de poder reductor necesario para afrontar estrés oxidativo (Christodoulou *et al.*, 2018). Finalmente, *nrdG* y *nrdH* forman parte de la maquinaria necesaria para la síntesis de desoxirribonucleótidos en condiciones anaerobias o de estrés, asegurando que la célula pueda replicar y reparar su ADN bajo presión ambiental (Torrents *et al.*, 2007).

Además de la activación de la respuesta antioxidante, *K. cowanii* Ch1 también activó mecanismos adicionales para asegurar la captación de metales esenciales, particularmente hierro y zinc. Esta es una respuesta característica de ambientes donde la disponibilidad de estos elementos suele ser limitada, como en el caso de la competencia microbiana (Ghoul & Mitri, 2016). Se sabe que el hierro forma parte de los recursos más disputados entre bacterias y hongos, ya que es indispensable

en funciones celulares y su concentración libre en el ambiente suele ser baja (Ghoul & Mitri, 2016). Debido a esto, *K. cowanii* Ch1 sobreexpresó genes clave relacionados con la captación de hierro mediante sideróforos. Se observó la expresión de *entCF*, un gen involucrado en la biosíntesis de enterobactina, el cual es un sideróforo de alta afinidad, utilizado por bacterias para secuestrar hierro en condiciones de competencia (Arnold, 2024). Este mecanismo fue complementado con la sobreexpresión de los genes *fepB*, *fepC*, *fepD*, *fes*, así como de *tonB*, *exbB* y *exbD*. *Estos genes codifican componentes esenciales del complejo hierro-enterobactina hacia el interior celular a través del sistema de transducción TonB-ExbBD, característico de bacterias Gram negativas. Por lo que esta podría ser una estrategia de la bacteria para poder asegurar el acceso al hierro y además limitar el crecimiento fúngico (Lau et al., 2016).*

Además de usar los sideróforos, *K. cowanii* Ch1 también activó de manera simultánea rutas para la captación de hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), como lo muestra la sobreexpresión de *feoA*, *feoB* y *feoC*, esenciales en ambientes microaerófilos o bajo estrés oxidativo donde el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es limitado (Lau et al., 2016). Por último, se observó la sobreexpresión de *fhuF*, una ferrireductasa que reduce hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) durante la liberación intracelular del hierro desde sideróforos. Esta actividad es relevante en contextos de estrés oxidativo, ya que el hierro libre puede catalizar la formación de radicales hidroxilos mediante reacciones de Fenton. Por ello, el control del estado redox del hierro podría representar una estrategia adicional de *K. cowanii* Ch1 para minimizar el daño inducido por ROS (Fasnacht, & Polacek, 2021).

Este entorno de estrés oxidativo y alteraciones redox probablemente causó un desequilibrio proteico dentro de la célula, reflejándose en la sobreexpresión de genes asociados a chaperonas y proteínas de choque térmico. En particular, se detectó una sobreexpresión marcada de *groL*, perteneciente a la familia de las chaperoninas tipo I, cuya función consiste en prevenir la agregación de proteínas

durante el estrés, como han confirmado estudios recientes que destacan su rol protector en ambientes térmicos y oxidativos (Taguchi & Koike-Takeshita, 2023).

De forma complementaria, se activaron los genes *dnaK*, *dnaJ* y *grpE*, que forman el sistema de chaperonas Hsp70 bacteriano. Este sistema no solo previene la agregación de proteínas parcialmente desnaturalizadas, sino que también las reconoce, estabiliza y facilita su correcto replegamiento mediante un ciclo altamente coordinado de hidrólisis de ATP (Mayer, 2021). Según Kim *et al.* (2021), en *Salmonella enterica* estas chaperonas son esenciales para la formación del complejo ARN polimerasa-DksA, necesario para iniciar la transcripción de genes durante el estrés oxidativo. Esto enfatiza que, además de su papel estructural, este sistema puede modular procesos regulatorios clave durante condiciones adversas. En este mismo sentido, Mayer (2021) subraya que *dnaK* funciona como una plataforma central capaz de interactuar con múltiples proteínas cliente, especialmente bajo estrés oxidativo, térmico y osmótico.

Además del sistema Hsp70, *K. cowanii* Ch1 sobreexpresó chaperonas y proteasas adicionales que refuerzan el control proteico. Entre ellos, *clpB* se activa como parte del sistema Hsp100, una chaperona que desempeña un papel central en la disolución de agregados proteicos. Esta proteína actúa en coordinación con *dnaK* para extraer y replegar polipéptidos parcialmente desnaturalizados, una función crítica durante el estrés por calor, oxidación o presión osmótica (Alam *et al.*, 2021). También se activó el gen *htpG*, que codifica una chaperona Hsp90 bacteriana esencial en la proteostasis celular, promoviendo el plegamiento, remodelación y activación de proteínas sustrato, además de protegerlas de la agregación y de la degradación bajo condiciones de estrés (Wickner *et al.*, 2021).

Por otro lado, se expresaron *ibpA* e *ibpB*, genes que codifican chaperonas pequeñas de choque térmico (sHSPs). Estas proteínas actúan como “holdases” de defensa inmediata y de bajo consumo energético durante el estrés severo, específicamente térmico u oxidativo. Actúan uniéndose a proteínas parcialmente

desnaturalizadas para evitar su agregación irreversible, de tal forma que se puedan estabilizar hasta que sistemas mayores como *dnak* o *ClpB* puedan replegarlas o estabilizarlas (Obuchowski *et al.*, 2021). Finalmente, se observó la activación de *degP*, una proteasa-chaperona periplásmica, que podría actuar degradando proteínas mal plegadas acumuladas durante la competencia (Kim *et al.*, 2021). En conjunto, estas respuestas indican una presión significativa sobre la homeostasis proteica de *K. cowanii* Ch1, posiblemente inducida por estrés oxidativo y la presencia de compuestos fúngicos liberados por *S. rolfesii*. La sobreexpresión de los múltiples sistemas de chaperonas sugiere que la preservación del proteoma fue un componente esencial en la estrategia de la bacteria para sobrevivir a las condiciones hostiles que se presentaron durante la interacción competitiva.

Una vez se activó la maquinaria para estabilizar las condiciones internas, *K. cowanii* Ch1 también mostró una activación coordinada de genes relacionados con la motilidad bacteriana y el ensamblaje flagelar. Entre los genes más relevantes se identificaron *flhC* y *flhD*, que codifican un regulador maestro responsable de coordinar la cascada transcripcional de la biosíntesis flagelar. Este complejo no solo inicia la expresión de los genes estructurales del flagelo, sino que también integra señales ambientales, permitiendo a la bacteria modular su motilidad en función de las condiciones del entorno (Sun *et al.*, 2022). De forma similar, en *E. coli* O157:H7, la activación de este mismo sistema se ha vinculado con la adaptación exitosa a entornos dinámicos durante procesos de colonización y competencia microbiana, reforzando su papel central en la respuesta adaptativa bacteriana (Sun *et al.*, 2022).

Este complejo también activa la transcripción del factor sigma menor *fliA*, otro gen sobreexpresado que regula casi exclusivamente genes involucrados en las etapas posteriores del ensamblaje flagelar, como el gen *fliC*, que codifica la flagelina, la subunidad principal del filamento (Buck *et al.*, 2021). Esto podría indicar que no solo se inició la síntesis, sino también el ensamblaje completo del flagelo. La presencia de *motA*, un motor impulsado por protones, indica que estos flagelos estaban

preparados para generar torque y permitir la rotación (Nakamura & Tohru Minamino, 2024).

En el entorno competitivo que se encuentra *K. cowanii* Ch1, este aumento de motilidad podría mostrar una respuesta de la bacteria para buscar zonas menos hostiles o con mayor disponibilidad de nutrientes, evadir áreas con presencia de compuestos fúngicos tóxicos, o favorecer su colonización en el entorno compartido. Apoyando esta idea, se observó la sobreexpresión de *cheY*, un componente clave en el sistema de quimiotaxis, permitiendo así el desplazamiento dirigido (Nakamura & Tohru Minamino, 2024). Además, se activó el regulador transcripcional *yeiE*, miembro de la familia *LysR*, asociado a la regulación de genes flagelares en respuesta a estímulos ambientales específicos, como cambios de osmolaridad o pH (Westerman *et al.*, 2021).

Mas allá de la motilidad, *K. cowanii* Ch1 activó genes clave involucrados en la adaptación frente a condiciones de competencia, lo que indica una respuesta más amplia ante la competencia con *S. rolfesii*. Uno de los genes más relevantes sobreexpresados fue *phoP*, un regulador transcripcional ampliamente conservado en bacterias Gram-negativas. Forma parte del componente *phoP/phoQ* y es importante para la patogénesis. Este sistema se activa cuando hay condiciones hostiles, como una baja disponibilidad de  $Mg^{2+}$ , pH ácido, o como se ha descrito en *Salmonella typhimurium*, por la presencia directa de péptidos antimicrobianos. Después de su activación, *phoP* inicia la expresión de genes para resistencia a estrés ácido, metales divalentes y agresiones químicas (Bader *et al.*, 2005). Esto sugiere que *K. cowanii* Ch1 podría estar enfrentando agresiones químicas similares, sobre todo por la presencia de compuestos fúngicos producidos por *S. rolfesii*.

Otro gen sobreexpresado fue *norR*, un regulador transcripcional que detecta óxido nítrico (NO) para la subsecuente activación de genes de desintoxicación, encargados de reducir este compuesto (Yu & Park, 2024). El NO es una especie

reactiva de nitrógeno que normalmente se genera durante interacciones microbianas, ya sea como producto del metabolismo fúngico o como parte de una respuesta defensiva. Aunque no se ha demostrado directamente en *S. rolfsii*, diversos estudios documentan la generación de óxido nítrico en hongos fitopatógenos durante su desarrollo, patogénesis o interacción con otros microorganismos (Yu & Park, 2024). Por ello, es posible que *S. rolfsii* produzca esta molécula reactiva de forma defensiva y *K. cowanii* Ch1 habría activado los mecanismos específicos para la desintoxicación.

Otro de los genes diferencialmente sobreexpresados fue *slyA*, un regulador transcripcional asociado a la tolerancia frente al estrés ambiental, la virulencia y la resistencia a antimicrobianos (Ellison & Miller, 2006). *nrdG* también sobresalió en el análisis. En condiciones anaerobias o de estrés, este gen codifica una proteína reductasa de clase III, lo que permite la síntesis de desoxirribonucleótidos, manteniendo la replicación y reparación del ADN en ambientes limitantes de oxígeno o bajo presión oxidativa (Boston & T. Atlung, 2003).

Finalmente, se detectó la sobreexpresión del gen *gntX*, que participa en la utilización de ADN extracelular como fuente de carbono, energía e incluso como sustrato para la transformación genética. En *E. coli*, estos genes se encuentran en operones distintos y son esenciales para metabolizar ADN, lo cual ha demostrado conferir una ventaja competitiva en ambientes con nutrientes limitados (Palchevskiy & Finkel, 2006). Además, *gntX* está vinculado al catabolismo de glucuronatos y gluconatos, proporcionando flexibilidad metabólica en condiciones de competencia. Su activación en *K. cowanii* Ch1 durante el co-cultivo con *S. rolfsii* podría indicar que la bacteria estaba aprovechando ADN liberado o metabolitos fúngicos como fuentes alternativas de nutrientes, o incluso que buscó incrementar su capacidad adaptativa mediante la adquisición de ADN ambiental.

De forma complementaria a la activación de rutas relacionadas con la defensa y la adaptación metabólica, se ha informado que, durante las interacciones microbianas



competitivas, los microorganismos también reprimen procesos no esenciales como una forma de ahorro energético y priorización de recursos. En *P. aeruginosa* y *E. coli*, por ejemplo, se ha observado una regulación negativa de rutas biosintéticas complejas o mecanismos de transporte costosos en entornos de estrés competitivo (Gottesman, 2019; Bram-Lories *et al.*, 2024). Este fenómeno, denominado como “competition sensing”, forma parte de una respuesta global, en la que la célula identifica cuando está en condiciones de competencia (ya sea por la limitación de nutrientes o daño celular), y ajusta tanto la activación de defensas como la represión de otras funciones metabólicas (Gottesman, 2019; Bram-Lories *et al.*, 2024). En el caso de *K. cowanii* Ch1, el co-cultivo con *S. rolfsii* indujo la regulación negativa de genes relacionados con el transporte de nutrientes, metabolismo de compuestos nitrogenados y fosforados, y degradación de compuestos aromáticos, lo que apunta a un ajuste metabólico estratégico frente a un entorno competitivo por recursos.

Una de las regulaciones a la baja más notable se observó en el metabolismo de los fosfonatos. En particular *phnF*, *phnH* y *phnI*, todos pertenecientes al operón *phn*. Este operón es regulado por el sistema de respuesta al fósforo PhoR–PhoB, que es activado cuando hay condiciones limitantes de fósforo inorgánico (Pi) y permite que la bacteria pueda usar compuestos fosforados orgánicos más complejos, como los fosfonatos. *phnF* codifica un represor transcripcional que regula negativamente al operón, mientras que *phnH* y *phnI* participan directamente en el transporte y catabolismo de estos compuestos (Stasi *et al.*, 2019; Richard *et al.*, 2025). La represión en conjunto de estos genes podría indicar que la bacteria se encuentra en un entorno donde el fósforo no representa una limitación, o bien está priorizando rutas metabólicas más esenciales para afrontar el entorno de competencia.

De forma similar, se detectó represión de genes relacionados con el transporte de compuestos nitrogenados y azufrados como *glnH*, *dppA*, *opuCA*, *cysW* y *ytfQ*, lo cual indica una posible limitación en la captación de aminoácidos, péptidos, osmoprotectores y azúcares complejos. Finalmente, también se observó la

represión de genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos como *pcaJ*, *hpaX* y QU629\_RS04710, lo que podría indicar que la bacteria no está invirtiendo recursos en catabolizar sustratos derivados del ambiente o del hongo, ya que estas rutas de degradación de aromáticos son metabólicamente costosas y, en condiciones de competencia por recursos, muchas bacterias reducen su inversión en ellas (Shrestha *et al.*, 2023).

En conjunto, los resultados transcriptómicos indican que *K. cowanii* Ch1 activó múltiples rutas enfocadas a resistir el estrés oxidativo, adquirir nutrientes esenciales y mantener la homeostasis proteica. Esta estrategia defensiva se acompañó de la represión de funciones no prioritarias, lo que sugiere un intento de reorganización metabólica frente a la presión impuesta por *S. rolfesii*. Sin embargo, el hecho de que la colonia bacteriana fuera sobrepasada por el crecimiento fúngico podría deberse a la intensidad del estrés generado por el hongo. Así, la interacción entre ambos organismos refleja un escenario en el que *K. cowanii* Ch1 responde activamente ante condiciones hostiles, pero no logra establecer una ventaja competitiva frente al hongo. Por lo tanto, esta evidencia plantea la necesidad de evaluar cómo la presencia de señales químicas adicionales, como los compuestos volátiles, podría modificar el curso de esta interacción y potenciar la eficacia de la bacteria frente a *S. rolfesii*.

### **Genes diferencialmente expresados en *K. cowanii* Ch1 durante la competencia directa con *S. rolfesii* en presencia de COV's**

A diferencia de lo observado en la interacción directa entre *K. cowanii* Ch1 y *S. rolfesii*, donde el hongo logró sobreponerse al crecimiento bacteriano, la presencia de COV's modificó drásticamente esta dinámica. En los ensayos *in vitro* la presencia de COV's resultó en una inhibición significativa del crecimiento micelial de *S. rolfesii*, demostrando que estas moléculas podrían alterar la dinámica de competencia y crear un entorno más favorable para la bacteria. Para entender cómo

esta condición influye en la respuesta molecular de *K. cowanii* Ch1, se realizó un análisis transcriptómico que permitió identificar los principales mecanismos activados o reprimidos durante esta interacción mediada por señales volátiles.

Durante esta interacción se observó la activación de una respuesta antioxidante más intensa por parte de la bacteria. A diferencia de la interacción sin COV's, en esta ocasión destacó la sobreexpresión de el gen *katG*, el cual codifica una catalasa-peroxidasa que descompone peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Esta enzima, al igual que *ahpC* (gen sobreexpresado en la interacción sin COV's), es regulada por el sistema transcripcional OxyR, pero responde a niveles más altos de peróxido en el entorno. Mientras que *ahpC* se activa ante concentraciones moderadas de  $H_2O_2$ , *katG*, lo hace en situaciones de estrés oxidativo más severo, por ello. Esto sugiere que la bacteria percibió un entorno más oxidante bajo la influencia de los COV's. (Seixas *et al.*, 2022).

Este incremento en el estrés oxidativo podría explicarse por una combinación de factores. Por un lado, los COV's bacterianos pueden alterar directamente el equilibrio redox del ambiente, actuando como señales difusas que perturban la homeostasis celular. Por otro, estudios previos han demostrado que los COV's bacterianos inducen daño morfológico en las hifas de los hongos, y podrían promover la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como respuesta defensiva por parte del hongo (Almeida *et al.*, 2023). De este modo, *K. cowanii* Ch1 no solo enfrenta a una competencia directa, sino también un entorno químicamente más hostil, lo que podría explicar la necesidad de activar enzimas como la catalasa para descomponer el exceso de peróxido.

En conjunto, la activación de *katG* y la continua expresión de genes como *ahpC*, *gapA*, *msrA*, *tpx* y QU629\_RS03245 indican que *K. cowanii* Ch1 mantiene activa su respuesta frente al estrés oxidativo, y además la adapta a un escenario más agresivo, donde la presión ambiental se intensifica por la combinación de competencia directa y señales químicas del entorno. Una manifestación visible de

esta respuesta podría ser el fenotipo de burbujas observado en los ensayos, ya que la actividad catalítica de *katG* descompone peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular ( $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2\uparrow$ ). En un sistema cerrado como las cajas, esta liberación de oxígeno podría generar acumulación local de gas, visible como burbujas alrededor de la colonia bacteriana (Imlay, 2013).

*K. cowanii* Ch1 también mantuvo la activación de rutas de obtención de hierro, incluyendo el sistema de enterobactina (*entS*, *entCF*, *fepBDG*, *tonB*, *exbBD*, *fes*) y el sistema *feoAB* para el transporte del hierro ferroso. Sin embargo, se expresó un operón que no se había detectado en la interacción sin COV's, *efeOU*. Este sistema, formado por EfeU (permeasa) y EfeO (proteína periplásmica), junto al peroxidasa EfeB en otros organismos, constituye un mecanismo de captación de hierro ferroso, que se activa especialmente en ambientes ácidos o con estrés oxidativo (Cao *et al.*, 2007). La aparición de *efeOU* bajo esta condición podría deberse a dos factores no excluyentes. Primero, a una modulación transcripcional inducida por los compuestos volátiles, ya que los sistemas de transporte de metales pueden ser sensibles a señales químicas ambientales (Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Cao *et al.*, 2007) y expresarse incluso anticipándose a un déficit de hierro. Segundo, estos volátiles podrían estar generando condiciones ligeramente ácidas o redox en el entorno inmediato al hongo, generando condiciones más ácidas o con un balance redox alterado. Esto favorecería la presencia de hierro en su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), en lugar de férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), lo cual coincide con las condiciones bioquímicas que activan la expresión del operón *efeOU* (Cao *et al.*, 2007).

Por otra parte, también se mantuvo la sobreexpresión de genes del sistema *znuABC*, encargado del transporte de iones de zinc, lo que indica que la necesidad de mantener la homeostasis metálica persiste incluso en presencia de compuestos volátiles. De forma paralela *K. cowanii* Ch1 también conservó la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad proteica, como *ibpAB*, *clpB*, *dnaJK*, *groL*, *degP* y *grpE*, junto con genes asociados a la estructura flagelar, incluyendo *flhACD*, *flgCDEFGHI* y *filFN*. Aunque todos estos genes ya se habían

activado durante la interacción sin compuestos volátiles, su expresión sostenida en presencia de COV's sugiere una necesidad continua de sostener tanto la funcionalidad proteica como la motilidad celular en condiciones celulares exigentes.

Diversos estudios han propuesto que ciertos compuestos volátiles bacterianos pueden modificar la dinámica de membrana, acidificar el microambiente o actuar como señales intracelulares, activando respuestas de protección y reorganización celular (Schulz-Bohm *et al.*, 2017). En lugar de representar necesariamente un daño directo, esta activación podría ser parte de una estrategia regulada por la propia bacteria, que percibe estos volátiles como señales endógenas de alarma o de adaptación. Así, la persistencia de estas rutas funcionales podría reflejar una plasticidad fisiológica que potencia la capacidad competitiva de *K. cowanii* Ch1, permitiéndole mantener su viabilidad y comportamiento dinámico en un entorno enriquecido con sus propios compuestos.

Además de estas rutas, *K. cowanii* Ch1 mostró una sobreexpresión de genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios con potencial antimicrobiano, reflejando una respuesta específica inducida por los COV's. Destaca la activación de QU629\_RS05045, una poliketido sintasa tipo I (PKS), y la aparición de QU629\_RS21570, que codifica una monooxigenasa relacionada con la biosíntesis de metabolitos bioactivos. Las PKS son enzimas multifuncionales, capaces de generar compuestos naturales estructuralmente complejos como antibióticos, antifúngicos y toxinas (Wang *et al.*, 2020). Por su parte, aunque esta monooxigenasa no fue caracterizada con precisión, este tipo de enzimas son ampliamente reconocidas por su papel en la modificación de metabolitos secundarios a través de reacciones como hidroxilación, epoxidación y N-oxidación, procesos que incrementan la bioactividad de los compuestos resultantes (Makhosazana *et al.*, 2020)

La aparición conjunta de estos dos genes únicamente en la condición con COV's sugiere que los compuestos volátiles no solo tienen un efecto inhibitorio sobre el hongo, sino que también actúan como moduladores transcripcionales,

desencadenando rutas metabólicas secundarias que podrían reforzar la acción competitiva de *K. cowanii* Ch1. Estudios previos indican que los COV's bacterianos pueden incrementar la expresión de biosintéticos antimicrobianos en otras especies (Kim *et al.*, 2013). De este modo, esta respuesta diferencial se alinea con una estrategia de defensa química activada por señales volátiles, potenciando la capacidad de la bacteria para producir compuestos antimicóticos bajo estrés competitivo.

En la interacción con COV's se detectaron muy pocos genes reprimidos, entre ellos una fosfodiesterasa (QU629\_RS19845) y una proteína de membrana poco caracterizada (QU629\_RS20060), con niveles de represión moderados. El análisis funcional de estos genes no arrojó categorías relevantes, a penas asociadas con procesos marginales como la degradación de esteroides y una oxidorreductasa no definida. Esto sugiere que la respuesta transcripcional estuvo centrada principalmente en activar mecanismos defensivos y adaptativos, sin una supresión clara de rutas metabólicas mayores.

Aunque es probable que múltiples procesos bioquímicos contribuyan al fenotipo de burbujas observado en los ensayos *in vitro* la sobreexpresión del gen *katG* constituye la explicación más directa y respaldada transcriptómicamente. Esta enzima catalasa-peroxidasa descompone peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, lo que, en condiciones de espacio cerrado, podría generar acumulación local de gas visible como burbujas. No se detectaron otras rutas metabólicas asociadas con la producción de gases, como fermentación o respiración anaerobia, ni tampoco indicios de supresión en genes clave que sugieran una desviación hacia estas vías. Por tanto, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la liberación de oxígeno por actividad catalasa fue el principal mecanismo implicado en este fenómeno.

Más allá del fenotipo observable, la inhibición total del crecimiento de *S. rolfsii* bajo esta condición parece ser el resultado de una combinación multifactorial. Por un

lado, los compuestos volátiles bacterianos probablemente modificaron el microambiente inmediato del hongo, generando condiciones hostiles como desequilibrio redox y alteraciones de pH. Por otro, la acumulación densa de la biomasa bacteriana en torno a la colonia fúngica, junto con la formación de estructuras burbujeantes, pudo haber creado una barrera física que restringió el avance del micelio. A esto se suma la activación de rutas moleculares clave en *K. cowanii* Ch1, orientadas a la defensa, la competencia por nutrientes y la producción de compuestos antimicrobianos. En conjunto, estas respuestas parecen haber generado un entorno desfavorable para el hongo, facilitando el desplazamiento y el predominio de la bacteria.

## 8. Conclusiones

En este estudio se demostró que los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Kosakonia cowanii* Ch1 tienen un papel activo en la regulación de su comportamiento competitivo frente a *Sclerotium rolfsii*. Más allá de su efecto inhibitorio directo sobre el hongo, los COV's actuaron como señales químicas capaces de modificar la dinámica de la interacción microbiana, generando un entorno más favorable para la bacteria.

La respuesta transcriptómica de *K. cowanii* Ch1 bajo esta condición reflejó una adaptación compleja, orientada a sostener su viabilidad celular, tolerar condiciones ambientales adversas y desplegar mecanismos de defensa más especializados. Este patrón apoya la hipótesis de que los COV's bacterianos no solo modifican el ambiente circundante, sino que también reprograman la fisiología del propio organismo emisor como parte de una estrategia integrada de competencia y supervivencia.

En conjunto, estos hallazgos fortalecen el potencial de *K. cowanii* Ch1 como agente de biocontrol, y destacan el valor biotecnológico de los COV's como moduladores de señales en comunidades microbianas. Comprender cómo estas moléculas influyen en la expresión genética ofrece nuevas perspectivas para desarrollar estrategias más eficientes y sostenibles en el manejo de fitopatógenos. Además, este trabajo destaca la relevancia de aplicar enfoques transcriptómicos para entender los mecanismos moleculares que subyacen a la competencia microbiana.

Sin embargo, serán necesarios estudios futuros adicionales que confirmen el papel del estrés oxidativo y, en particular, de la enzima catalasa como posibles responsables del fenotipo observado, así como su implicación funcional dentro del sistema defensivo de *K. cowanii* Ch1.



## 9. Referencias bibliográficas

Agrios, G. N. (1999). Fitopatología. Editorial Limusa. México, D. F. 838-840

Alam, A., Bröms, J. E., Kumar, R., & Anders Sjöstedt. (2021). The Role of ClpB in Bacterial Stress Responses and Virulence. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.668910>

Arnold, E. (2024). Non-classical roles of bacterial siderophores in pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1465719>

Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., and Vero, S. (2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biol. Control*, 109, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.002>

Ashitha, A., Midhun, S.J., Sunil, M.A., Nithin, T.U., Radhakrishnan, E.K., Mathew, J. (2019). Bacterial endophytes from *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp., with antibacterial efficacy against human pathogens. *Microb. Pathog*, 135, 103624. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103624>.

Almeida, O. A. C., de Araujo, N. O., Dias, B. H. S., de Sant'Anna Freitas, C., Coerini, L. F., Ryu, C. M., & de Castro Oliveira, J. V. (2023). The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Frontiers in microbiology*, 13, 951130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.951130>

Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., & Miller, S. I. (2005). Recognition of Antimicrobial Peptides by a Bacterial Sensor Kinase. *Cell*, 122(3), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.030>

Báez-Vallejo N, Camarena-Pozos D. A., Monribot-Villanueva J. L., Ramírez-Vázquez M., Carrión-Villarnovo G. L., Guerrero-Analco J. A., Partida-Martínez L. P., y Reverchon F. (2020). Forest tree associated bacteria for potential biological control of *Fusarium solani* and of *Fusarium kuroshium*, causal agent of *Fusarium dieback*. *Microbiological Research*, 235, 126440. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126440>.

Barnett, H. L. & Barry, B. H. (1987). Illustrated genera of imperfect fungi. 4a ed. Macmillan Publishing Company. New York, U.S.A. 218 p.

- Bitas, V., Kim, H. S., Bennett, J. W., and Kang, S. (2013). Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 26, 835–843. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-12-0249-CR>
- Boston, T., & T. Atlung. (2003). FNR-Mediated Oxygen-Responsive Regulation of the nrdDG Operon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5310–5313. <https://doi.org/10.1128/jb.185.17.5310-5313.2003>
- Bram-Lories, Tom, Smeets, B., & Steenackers, H. P. (2024). Competition quenching strategies reduce antibiotic tolerance in polymicrobial biofilms. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00489-6>
- Buck, L. D., Paladino, M. M., Nagashima, K., Brezel, E. R., Holtzman, J. S., Urso, S. J., & Ryno, L. M. (2021). Temperature-Dependent Influence of FliA Overexpression on PHL628 *E. coli* Biofilm Growth and Composition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.775270>
- Cabrera, R., Sharon Palafox F., Valenzuela A.I. (2019). Estrategias para el control del hongo fitopatógeno *Fusarium* en el sector agrícola: del control químico al control biológico. *Revista Frontera Biotecnológica*, 12, 19-26.
- Calvo H., Mendiara I., Arias E., Gracia A. P., Blanco D., Venturini M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biol. Technol.* 166, 111208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111208>
- Cao, J., Woodhall, M. R., Alvarez, J., Cartron, M. L., & Andrews, S. C. (2007). EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe<sup>2+</sup> transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, 65(4), 857–875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05802.x>
- Carreras-Villaseñor, N., Hernández Domínguez, E., & Sánchez Rangel, D. (2023). Conociendo a los hongos fitopatógenos. Instituto de Ecología (INECOL).
- Chet, I. and Henis, Y. (1968). X-ray analysis of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Can. J. Microbiol*, 14, 815-16 pp. <https://doi.org/10.1139/m68-138>
- Choudoir, M., Rossabi, S., Gebert, M., Helmig, D., & Fierer, N. (2019). A Phylogenetic and Functional Perspective on Volatile Organic Compound Production by *Actinobacteria*. *mSystems*, 4(2), e00295-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00295-18>
- Christias, C. (1980). Nature of the sclero-tial exudate of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Soil Biol. Biochem*, 12, 199-201. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(80\)90061-9](https://doi.org/10.1016/0038-0717(80)90061-9)

- Christodoulou, D., Link, H., Fuhrer, T., Kochanowski, K., Gerosa, L., & Sauer, U. (2018). Reserve Flux Capacity in the Pentose Phosphate Pathway Enables *Escherichia coli*'s Rapid Response to Oxidative Stress. *Cell systems*, 6(5), 569–578.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.04.009>
- Dalilla, C. R., Mauricio, B. F., Simone, C. B., Silvia, B., and Sergio, F. P. (2015). Antimicrobial activity of volatile organic compounds and their effect on lipid peroxidation and electrolyte loss in *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum acutatum* mycelia. *Afr. J. Microbiol. Res*, 9, 1527–1535. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7425>
- Delgado, N., Olivera, M., Cádiz, F., Bravo, G., Montenegro, I., Madrid, A., et al. (2021). Volatile organic compounds (VOCs) produced by *Gluconobacter cerinus* and *Hanseniaspora osmophila* displaying control effect against table grape-rot pathogens. *Antibiot*, 10, 663–681. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060663>
- Dennis, C. and Webster, J. (1971). Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*: II. Production of Volatile Antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 363-369. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5)
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(9), 1498–1513. Doi: 10.1080/10408398.2017.1417235
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of chemical ecology*, 38(6), 665–703. Doi: 10.1007/s10886-012-0135-5
- Ellison, D. W., & Miller, V. L. (2006). Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.02.003>
- FAO. (2001). Manual de capacitación. La importancia de comer frutas y hortalizas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 46. FAO, Roma.
- Farías-Vázquez, L. S., Ramos González, R., Pacios Michelena, S., Aguilar González, C. N., Arredondo Valdés, R., Rodríguez Herrera, R., Martínez Hernández, J. L., Segura Ceniceros, E. P., Gonçalves da Silva, T., & Iliná, A. (2025). El control biológico como una alternativa para combatir las enfermedades y plagas de los cultivos agrícolas. *CienciCierta*, 1974(74), 55-68. <https://revistas.uadec.mx/index.php/CienciaCierta/article/view/326>
- Fasnacht, M., & Polacek, N. (2021). Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037>

- Freitas, C. S. A., Maciel, L. F., Corrêa Dos Santos, R. A., Costa, O. M. M. M., Maia, F. C. B., Rabelo, R. S., Franco, H. C. J., Alves, E., Consonni, S. R., Freitas, R. O., Persinoti, G. F., & Oliveira, J. V. C. (2022). Bacterial volatile organic compounds induce adverse ultrastructural changes and DNA damage to the sugarcane pathogenic fungus *Thielaviopsis ethacetica*. *Environmental microbiology*, 24(3), 1430–1453. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15876>
- Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., & de Boer, W. (2014). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Frontiers in microbiology*, 5, 289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00289>
- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Meza, GD (2012). Problemática Y Riesgo Ambiental Por El Uso De Plaguicidas En Sinaloa. *Ra Ximhai* , 8 (3b), 1-10. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177005>
- Genin, S., Brito, B., Denny, T. P., and Boucher, C. (2005). Control of the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett*, 579, 2077–2081. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.058>
- Ghoul, M., & Mitri, S. (2016). The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends in Microbiology*, 24(10), 833–845. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011>
- González-Espinosa, J., Hernández Gómez, Y. F., Javier Martínez, Y., Flores Gallardo, F. J., Pacheco Aguilar, J. R., Ramos López, M. Á., Arvizu 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(7), 1758. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071758>
- González, A. J. (2013). *Sclerotium rolfsii*, un patógeno de judía que produce daños de forma ocasional. Tecnología Agroalimentaria: Boletín Informativo Del SERIDA.11,19–20.
- Gottesman, S. (2019). Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 294(31), 11685–11700. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev119.005593>
- Guevara-Avendaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., von Wobeser, E. A., et al. (2019). Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium sp.* associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiol. Res.* 219, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.009>

Hassan, Z.U., al Thani, R., Atia, F. A., Alsafran, M., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2021). Application of yeasts and yeast derivatives for the biological control of toxigenic fungi and their toxic metabolites. *Environmental Technology and Innovation*, 22: 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101447>

He, C. N., Ye, W. Q., Zhu, Y. Y., & Zhou, W. W. (2020). Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(15), 3360. <https://doi.org/10.3390/molecules25153360>

Hernández Flores, J. L., Martínez, Y. J., Ramos López, M. Á., Saldaña Gutierrez, C., Reyes, A. A., Armendariz Rosales, M. M., Cortés Pérez, M. J., Mendoza, M. F., Ramírez Ramírez, J., Zavala, G. R., 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(10),2491.<https://doi.org/10.3390/microorganisms11102491>

Hernández Gómez, Y. F., González Espinosa, J., Ramos López, M. Á., Arvizu Gómez, J. L., Saldaña, C., Rodríguez Morales, J. A., García Gutiérrez, M. C., Pérez Moreno, V., Álvarez Hidalgo, E., Nuñez Ramírez, J., Jones, G. H., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2022). Insights into the Bacterial Diversity and Detection of Opportunistic Pathogens in Mexican Chili Powder. *Microorganisms*, 10(8), 1677. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081677>

Imlay J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual review of biochemistry*, 77, 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>

Imlay, J. A. (2013). The Molecular Mechanisms and Physiological Consequences of Oxidative Stress: Lessons from a Model Bacterium. *Nat. Publ. Gr*, 11, 443–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>

Irazoqui, A. M. B. (2021). Identificación de especies de *Trichoderma* y su antagonismo in vitro contra *Sclerotium rolfsii* proveniente del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) del norte de Sinaloa, México. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma De Occidente Unidad Regional Los Mochis]. Repositorio Institucional de Universidad Autónoma De Occidente. [https://uadeo.mx/wp-content/uploads/2022/02/TESIS\\_BELEN\\_IRAZOQUI.pdf](https://uadeo.mx/wp-content/uploads/2022/02/TESIS_BELEN_IRAZOQUI.pdf)

Jan-Roblero, J., J.A. Cruz-Maya, and C.G. Barajas. (2020). Chapter 12 - *Kosakonia*, in Beneficial Microbes in Agro-Ecology, N. Amaran Editors., Academic Press. 213-231.

- Jenkins, S. F. & Averre, C. W. (1986). Problems and progress in integrated control of southern blight of vegetables. *Plant Disease*, 70, 614-619.
- Jenkins, S. F. (1985). Effect of preplant soil fumigation and postplant fungicide application on control of southern blight of tomato. *Phytopathology*, 75, 1362.
- Kai, M., Uta Effmert, Berg, G., & Piechulla, B. (2006). Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, 187(5), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0199-0>
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., and Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci*, 6, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>
- Khokhani, D., Lowe-Power, T. M., Tran, T. M., and Allen, C. (2017). A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *mBio* 8:e00895-17. Doi: 10.1128/mBio.00895-17
- Kim, H., Wu, K., & Lee, C. (2021). Stress-Responsive Periplasmic Chaperones in Bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.678697>
- Kim, J.-S., Liu, L., & Vázquez-Torres, A. (2021). The DnaK/DnaJ Chaperone System Enables RNA Polymerase-DksA Complex Formation in *Salmonella* Experiencing Oxidative Stress. *MBio*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.03443-20>
- Kim, K., Lee, S., & Ryu, C.-M. (2013). Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms2789>
- Kumar, P., Pandhi, S., Mahato, D. K., Kamle, M., & Mishra, A. (2021). *Bacillus* based nano-bioformulations for phytopathogens and insect-pest management. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31 (1): 2-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00475-6>
- Laatikainen, T., & Heinonen-Tanski, H. (2002). Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. *Microbiological research*, 157(2), 127–137. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00139>
- Langston. (2023). *Ilustración de Sclerotium* [Ilustración]. En *Centro de formación: perfil de agente patógeno Sclerotium*. PTHorticulture. <https://www.pthorticulture.com/es-us/centro-de-formacion/perfil-de-agente-patogeno-sclerotium>

Lastres, L., Soza, F. (2009). Manual de Sanidad Vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. p. 75.

Lau, C. K., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS microbiology reviews*, 40(2), 273–298. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049>

Lemfack MC, Nickel J, Dunkel M, Preissner R, Piechulla B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 42: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250>

Li H, Zhou X, Huang Y, Liao B, Cheng L and Ren B. (2021). Reactive Oxygen Species in Pathogen Clearance: The Killing Mechanisms, the Adaption Response, and the Side Effects. *Front. Microbiol.* 11:622534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622534>

Liu, R., Xu, C., Zhang, Q., Wang, S., and Fang, W. (2017). Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaption to ecological niches. *Sci. Rep.* 7:44527. <https://doi.org/10.1038/srep44527>

López J. A, Martínez C, Moreno L, Navarrete P. (1992). Las aguas subterráneas y los plaguicidas. Instituto Geológico y minero de España. 149 p.

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The Evolution of Fungicide Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 29–92. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

Makhosazana Jabulile Khumalo, Nomfundo Nzuzo, Padayachee, T., Chen, W., Yu, J.-H., Nelson, D. R., & Syed, K. (2020). Comprehensive Analyses of Cytochrome P450 Monooxygenases and Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters in Cyanobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 656–656. <https://doi.org/10.3390/ijms21020656>

Mayer, M. P. (2021). The Hsp70-Chaperone Machines in Bacteria. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.694012>

Mena Navarro, M. P., Espinosa Bernal, M. A., Martínez-Avila, A. E., Aponte Pineda, L. S., Montes Flores, L. A., Chan Ku, C. D., Hernández Gómez, Y. F., González Espinosa, J., Pacheco Aguilar, J. R., Ramos López, M. Á., Arvizu Gómez, J. L., Saldaña Gutierrez, C., Rodríguez Morales, J. A., Amaro Reyes, A., Hernández Flores, J. L., & Campos Guillén, J. (2024). Role of Volatile Organic Compounds Produced by *Kosakonia cowanii* Cp1 during Competitive Colonization Interaction against *Pectobacterium aroidearum* SM2. *Microorganisms*, 12(5), 930. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050930>

- Misztal, P. K., Lymperopoulou, D. S., Adams, R. I., Scott, R. A., Lindow, S. E., Bruns, T., et al. (2018). Emission factors of microbial volatile organic compounds from environmental bacteria and fungi. *Environ. Sci. Technol.* 52, 8272–8282. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00806>
- Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., Ueno, D., and Someya, T. (2019). Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon* 5:e01817. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>
- Mulinari, J., Andrade, C.J., Lima Brandao, H., Silva, A., Souza S.M., Souza, A.U. (2020). Enhanced textile wastewater treatment by a novel biofilm carrier with adsorbed nutrients. *Biocatal. Agric. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101527. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101527>
- Mullen, J. (2001). Southern blight, Southern stem blight, White mold. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2001-0104-01>.
- Muñoz-Torres, Patricio Alberto. (2018). Microorganismos como una alternativa al uso de agroquímicos. *Idesia* (Arica), 36(1), 3-5. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292018000100003>
- Nakamura, S., & Tohru Minamino. (2024). Structure and Dynamics of the Bacterial Flagellar Motor Complex. *Biomolecules*, 14(12), 1488–1488. <https://doi.org/10.3390/biom14121488>
- Nguyen, H. T. T., Park, A. R., Hwang, I. M., & Kim, J. C. (2021). Identification and delineation of action mechanism of antifungal agents: Reveromycin E and its new derivative isolated from *Streptomyces* sp. JCK-6141. *Postharvest Biology and Technology*, 182, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111700>
- Noori, F., Etesami, H., Najafi Zarini, H., Khoshkholgh-Sima, N. A., Hosseini Salekdeh, G., & Alishahi, F. (2018). Mining alfalfa (*Medicago sativa* L.) nodules for salinity tolerant non-rhizobial bacteria to improve growth of alfalfa under salinity stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 162, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.092>
- Obuchowski, I., Piotr Karaś, & Krzysztof Liberek. (2021). The Small Ones Matter—sHsps in the Bacterial Chaperone Network. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.666893>
- Palchevskiy, V., & Finkel, S. E. (2006). *Escherichia coli* Competence Gene Homologs Are Essential for Competitive Fitness and the Use of DNA as a Nutrient. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3902–3910. <https://doi.org/10.1128/jb.01974-05>



- Papapostolou, I., Sideri, M., & Georgiou, C. D. (2014). Cell proliferating and differentiating role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Sclerotium rolfii* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Microbiological Research*, 169(7-8), 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.002>
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe-Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus spp.* (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 112-125. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1054662>
- Piechulla, B., & Degenhardt, J. (2014). The emerging importance of microbial volatile organic compounds. *Plant, cell & environment*, 37(4), 811–812. <https://doi.org/10.1111/pce.12254>
- Pineda, J. B. y Díaz, P. C. 1981. Control biológico de *Sclerotium rolfii* Sacc. en *Phaseolus vulgaris* mediante la utilización de *Penicillium notatum* Westl. *Agronomía Tropical* 31: 265-281
- Punja, Z. K. (1985). The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfii*. *Annual Review of Phytopathology*. 23,97-127. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000525>
- Qadri, M., Deshidi, R., Shah, B. A., Bindu, K., Vishwakarma, R. A., and Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). An endophyte of *Picrorhiza kurroa* Royle ex. Benth, producing menthol, phenylethyl alcohol and 3-hydroxypropionic acid, and other volatile organic compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1647–1654. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1910-6>
- Ramírez, R., Santos, R., Brachol, F., Sandoval, L., & Castro de Rincón, C. (1998). Control de *Sclerotium rolfii* Sacc con fungicidas y humus. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 15(6), 534–544. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26227>
- Ramírez-Campos, Marco. (2020). El Uso De Pesticidas En La Agricultura Y Su Desorden Ambiental. *Revista Enfermería la Vanguardia*. 6, 40-47. <https://doi.org/10.35563/revan.v6i2.210>.
- Rana, A., Sudakov, K., Carmeli, S., Miyara, S. B., Bucki, P., & Minz, D. (2024). Volatile organic compounds of the soil bacterium *Bacillus halotolerans* suppress pathogens and elicit defense-responsive genes in plants. *Microbiological research*, 281, 127611. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127611>
- Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q., et al. (2016). Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth

and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 100, 7639–7650. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7584-7>

Richard, P. I., Baltosser, W. H., Williams, P. H., & He, Q. (2025). Phylogenetic analysis of microbial CP-lyase cluster genes for bioremediation of phosphonate. *AMB Express*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-025-01856-y>

Rivas T. G. (2018). Mecanismos de acción de microorganismos marinos y el inductor de resistencia Ulvan para el control de *Fusarium proliferatum* en frutos de *Cucumis melo* L. var. Reticulatus. Tesis de Doctor en Ciencias. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. La Paz, Baja California Sur.

Roncero, M. I. G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., García Maceira, F. I., Madrid, M. P., Caracuel, Z., *et al.* (2003). *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 62, 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00043-2)

Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME journal*, 9(11), 2329–2335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>

Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Paolina Garbeva. (2017). Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>

Seixas, A. F., Quendera, A. P., Sousa, J. P., Silva, A. F. Q., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2022). Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation. *Frontiers in genetics*, 12, 821535. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535>

Seo, S. W., Kim, D., Szubin, R., & Palsson, B. O. (2015). Genome-wide Reconstruction of OxyR and SoxRS Transcriptional Regulatory Networks under Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12 MG1655. *Cell reports*, 12(8), 1289–1299. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.043>

Shim, M. Y., Starr, J. L., Keller, N. P., Woodard, K. E., & Lee, T. A., Jr (1998). Distribution of Isolates of *Sclerotium rolfsii* Tolerant to Pentachloronitrobenzene in Texas Peanut Fields. *Plant disease*, 82(1), 103–106. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.103>

Shrestha, S., Awasthi, D., Chen, Y., Gin, J., Petzold, C. J., Adams, P. D., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2023). Simultaneous carbon catabolite repression governs sugar and aromatic co-utilization in *Pseudomonas putida* M2. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(10). <https://doi.org/10.1128/aem.00852-23>

- Sideri, M., & Georgiou, C. D. (2000). Differentiation and hydrogen peroxide production in *Sclerotium rolfsii* induced by the oxidizing growth factors, light and iron. *Mycologia*, 92(6), 1033–1042. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061248>
- Singh, R. K. and Dwivedi, R. S. (1991). Ecology and biology of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *International Journal of Tropical Plant Diseases* 9, 161-171.
- Soto, M. J., Sanjuán, J., & Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 11), 3167–3174. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29112-0>
- Stasi, R., Neves, H. I., & Spira, B. (2019). Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1445-3>
- Sun, H., Wang, M., Liu, Y., Wu, P., Yao, T., Yang, W., Yang, Q., Yan, J., & Yang, B. (2022). Regulation of flagellar motility and biosynthesis in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut Microbes*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2110822>
- Taguchi, H., & Ayumi Koike-Takeshita. (2023). In vivo client proteins of the chaperonin GroEL-GroES provide insight into the role of chaperones in protein evolution. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1091677>
- Tahir, H. A., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., and Gao, X. (2017). *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Sci. Rep.* 7:40481. <https://doi.org/10.1038/srep40481>
- Tang, T., Wang, F., Huang, H., Guo, J., Guo, X., Duan, Y., Wang, X., Wang, Q., & You, J. (2024). *Bacillus velezensis* LT1: a potential biocontrol agent for southern blight on *Coptis chinensis*. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1337655>
- Torrents, E., Grinberg, I., Gorovitz-Harris, B., Lundström, H., Borovok, I., Aharonowitz, Y., Sjöberg, B. M., & Cohen, G. (2007). NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *Journal of bacteriology*, 189(14), 5012–5021. <https://doi.org/10.1128/JB.00440-07>
- Vasseur-Coronado, M., Anthi Vlassi, du, D., Schuhmacher, R., Parich, A., I. Pertot, & Puopolo, G. (2021). Ecological Role of Volatile Organic Compounds Emitted by *Pantoea agglomerans* as Interspecies and Interkingdom Signals. *Microorganisms*, 9(6), 1186–1186. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061186>

- Wang, E., Liu, X., Si, Z., Li, X., Bi, J., Dong, W., Chen, M., Wang, S., Zhang, J., Song, A., & Fan, F. (2021). Volatile Organic Compounds from Rice Rhizosphere Bacteria Inhibit Growth of the Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Agriculture*, 11(4), 368–368. <https://doi.org/10.3390/agriculture1104036>
- Wang, J., Zhang, R., Chen, X., Sun, X., Yan, Y., Shen, X., & Yuan, Q. (2020). Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01367-4>
- Wang, K., Qin, Z., Wu, S., Zhao, P., Zhen, C., and Gao, H. (2021b). Antifungal mechanism of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* assessed using omics technology. *J. Agric. Food Chem.* 69, 5267–5278. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00640>
- Weisskopf, L., Schulz, S., & Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 19(6), 391–404. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00508-1>
- Westerman, T. L., McClelland, M., & Elfenbein, J. R. (2021). YeiE Regulates Motility and Gut Colonization in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *MBio*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.03680-20>
- Wickner, S., Nguyen, T.-L. L., & Genest, O. (2021). The Bacterial Hsp90 Chaperone: Cellular Functions and Mechanism of Action. *Annual Review of Microbiology*, 75(1), 719–739. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032421-035644>
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C., & Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *MicrobiologyOpen*, 8(8). <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>
- Yalage-Don, S. M., Schmidtke, L. M., Gambetta, J. M., and Steel, C. C. (2021). Volatile organic compounds produced by *Aureobasidium pullulans* induce electrolyte loss and oxidative stress in *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. *Res. Microbiol.* 172, 103788. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.10.003>
- Yang, X.-J., Wang, S., Cao, J.-M., & Hou, J.-H. (2018). Complete genome sequence of human pathogen *Kosakonia cowanii* type strain 888-76 T. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1), 16–17. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.010>
- Yang, M., Lu, L., Pang, J., Hu, Y., Guo, Q., Li, Z., et al. (2019). Biocontrol activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1 against *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *J. Microbiol.* 57, 396–404. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8517-9>

Yu, N.-N., & Park, G. (2024). Nitric Oxide in Fungi: Production and Function. *Journal of Fungi*, 10(2), 155. <https://doi.org/10.3390/jof10020155>

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., y Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Applied and environmental microbiology*, 78(16), 5942-5944. <https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12>

Yue, Y., Wang, Z., Zhong, T., Guo, M., Huang, L., Yang, L., Kan, J., Zalán, Z., Hegyi, F., Takács, K., & Du, M. (2023). Antifungal mechanisms of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX as biological fumigants against *Botrytis cinerea*. *Microbiological research*, 267, 127253. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127253af>

Zhao, X., Zhou, J., Tian, R., & Liu, Y. (2022). Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450>

## 10. Anexos

En este apartado se presentan las tablas complementarias correspondientes a los genes diferencialmente expresados obtenidos a partir del análisis transcriptómico realizado en este estudio. Estas tablas incluyen los genes más representativos identificados en cada una de las condiciones experimentales evaluadas.

Anexo 1. Principales genes diferencialmente expresados en *K. cowanii* Ch1 durante la interacción con *S. rolfsii* en ausencia de COV's.

Gene	ID	Description	Log2FoldChange
QU629_RS04135	QU629_RS04135	Endonuclease IV	5.813828467
QU629_RS21790	QU629_RS21790	Zinc ABC transporter, permease protein ZnuB	5.686304244
QU629_RS21795	QU629_RS21795	Zinc ABC transporter, substrate-binding protein ZnuA	5.668940418
QU629_RS01540	QU629_RS01540	Multiple stress resistance protein BhsA	5.406536877
QU629_RS16930	QU629_RS16930	2-Oxobutyrate oxidase	5.314873984
<i>ibpB</i>	QU629_RS08580	16 kDa heat shock protein B	5.161516989
<i>yhcN</i>	QU629_RS12965	Probable exported protein YPO3518	5.124143803
<i>ibpA</i>	QU629_RS08585	16 kDa heat shock protein A	4.491736004
<i>Gap</i>	QU629_RS20245	NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.373717339
QU629_RS04595	QU629_RS04595	Transcriptional regulator YqjI	4.289350676
<i>mdtJ</i>	QU629_RS00190	Spermidine export protein MdtJ	4.226187686
QU629_RS14015	QU629_RS14015	Enterobactin esterase	4.12180492
<i>Asr</i>	QU629_RS00170	Acid shock protein precursor	4.076390679
QU629_RS20110	QU629_RS20110	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	4.046607462
<i>fhuF</i>	QU629_RS20590	Ferric reductase	3.997824411
<i>mdtI</i>	QU629_RS00185	Spermidine export protein MdtI	3.991841233
<i>degP</i>	QU629_RS06980	HtrA protease/chaperone protein	3.91158984
QU629_RS02135	QU629_RS02135	dehydratase	3.907931239
<i>exbB</i>	QU629_RS04865	TonB-ExbBD energy transducing system	3.845612374
QU629_RS22020	QU629_RS22020	Phenazine biosynthesis protein PhzF like	3.801701856
<i>entC</i>	QU629_RS13980	Isochorismate synthase	3.782713484

<i>Spy</i>	QU629_RS00840	Spheroplast protein Y	3.763658189
<i>mgtA</i>	QU629_RS12445	Mg(2+) transport ATPase, P-type	3.64345109
QU629_RS10065	QU629_RS10065	Phenolic acid decarboxylase	3.641014858
QU629_RS13845	QU629_RS13845	Siderophore achromobactin ABC transporter, permease protein	3.468290061
<i>kdpA</i>	QU629_RS19735	Potassium-transporting ATPase A chain	3.411039208
<i>rpmE</i>	QU629_RS17815	LSU ribosomal protein L31p	3.287944719
QU629_RS20300	QU629_RS20300	2-oxoglutarate/malate translocator	3.270279319
<i>exbD</i>	QU629_RS04870	TonB-ExbBD energy transducing system	3.165936765
<i>ahpC</i>	QU629_RS13750	Alkyl hydroperoxide reductase protein C	3.157272575
<i>kdpB</i>	QU629_RS19740	Potassium-transporting ATPase B chain	3.126541533
<i>fepD</i>	QU629_RS13995	Ferric enterobactin transport system permease protein FepD	3.093925432
QU629_RS01865	QU629_RS01865	Transcriptional regulator LysR family	3.063039628
<i>znuC</i>	QU629_RS16225	Zinc ABC transporter, ATP-binding protein ZnuC	3.001216976
<i>gntX</i>	QU629_RS09800	Competence protein F homolog	2.990090654
<i>fepB</i>	QU629_RS13985	Ferric enterobactin-binding periplasmic protein FepB	2.989072191
<i>azuC</i>	QU629_RS19115	Stress response protein AzuC	2.979672329
QU629_RS01240	QU629_RS01240	Transcriptional regulator, AcrR family	2.963219562
<i>nrdH</i>	QU629_RS11320	Glutaredoxin-like protein NrdH	2.924228323
QU629_RS16935	QU629_RS16935	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	2.908772815
<i>grpE</i>	QU629_RS11790	Heat shock protein GrpE	2.904571587
<i>phoP</i>	QU629_RS01420	Transcriptional regulatory protein PhoP	2.869201653
QU629_RS16945	QU629_RS16945	Methionine ABC transporter permease protein	2.828729751
QU629_RS01110	QU629_RS01110	Transcriptional regulator HxlR family	2.800283272
QU629_RS16940	QU629_RS16940	Methionine ABC transporter ATP-binding protein	2.768243224
<i>Edd</i>	QU629_RS16260	Phosphogluconate dehydratase	2.766234859
<i>clpB</i>	QU629_RS12040	Chaperone protein ClpB (ATP-dependent unfoldase)	2.762010024
<i>grcA</i>	QU629_RS10465	Autonomous glycyl radical cofactor	2.71929221
QU629_RS13925	QU629_RS13925	Hydroxycarboxylate dehydrogenase	2.673667612
QU629_RS12815	QU629_RS12815	Sensory box/GGDEF family protein	2.659469824
<i>feoA</i>	QU629_RS09770	Ferrous iron transporter-associated protein FeoA	2.651672404
QU629_RS00180	QU629_RS00180	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase	2.62981541
<i>punC</i>	QU629_RS00520	Inner membrane transport protein YdhC	2.619276479

QU629_RS12280	QU629_RS12280	UPF0053 inner membrane protein YtfL	2.615674407
<i>ahpF</i>	QU629_RS13745	Alkyl hydroperoxide reductase protein F	2.605578297
QU629_RS20385	QU629_RS20385	Ferrichrome-iron receptor	2.58798263
<i>tonB</i>	QU629_RS06685	TonB-ExbBD energy transducing system	2.580075203
QU629_RS04345	QU629_RS04345	Osmoprotectant ABC transporter inner membrane protein YehW	2.567932182
<i>feoB</i>	QU629_RS09765	Ferrous iron transporter FeoB	2.555024664
<i>flgC</i>	QU629_RS11475	Flagellar basal-body rod protein FlgC	2.552953701
<i>marA</i>	QU629_RS22000	Multiple antibiotic resistance protein MarA	2.495516326
<i>nrdI</i>	QU629_RS11315	Ribonucleotide reduction protein NrdI	2.487998855
QU629_RS20365	QU629_RS20365	Iron compound ABC transporter, permease protein	2.479046381
<i>phoQ</i>	QU629_RS01425	Sensor histidine kinase PhoQ	2.476953707
<i>fabF</i>	QU629_RS20115	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII	2.461938868
QU629_RS16765	QU629_RS16765	Protein QmcA	2.460277649
<i>znuB</i>	QU629_RS16220	Zinc ABC transporter, permease protein ZnuB	2.453748263
QU629_RS04240	QU629_RS04240	Inner membrane protein YohK	2.449583597
<i>dnaK</i>	QU629_RS07580	Chaperone protein DnaK	2.437022654
QU629_RS20360	QU629_RS20360	Iron compound ABC transporter, permease protein	2.426937579
<i>mlaD</i>	QU629_RS13120	Phospholipid ABC transporter substrate-binding protein MlaD	2.388739368
<i>hslV</i>	QU629_RS17835	ATP-dependent protease subunit HslV	2.377981957
QU629_RS09545	QU629_RS09545	Heat shock protein 10 kDa family chaperone	2.371853457
<i>ybeD</i>	QU629_RS13655	Proposed lipoate regulatory protein YbeD	2.371058258
<i>dnaJ</i>	QU629_RS07575	Chaperone protein DnaJ	2.360203869
<i>marB</i>	QU629_RS21995	Multiple antibiotic resistance protein MarB	2.34557562
QU629_RS19045	QU629_RS19045	BarA-associated response regulator UvrY	2.321308638
QU629_RS06235	QU629_RS06235	LysR family transcriptional regulator YdcI	2.316964659
<i>dacC</i>	QU629_RS02795	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	2.314414281
<i>tatE</i>	QU629_RS13675	Twin-arginine translocation protein TatE	2.313124146
QU629_RS13915	QU629_RS13915	5-methylthioribose ABC transporter, permease protein	2.305813691
QU629_RS02160	QU629_RS02160	CFA/I fimbrial major subunit	2.301688903
<i>feoC</i>	QU629_RS09760	Ferrous iron-sensing transcriptional regulator FeoC	2.29966565
<i>yceG</i>	QU629_RS01615	Murein endolytic transglycosylase MltG	2.286341522
<i>groL</i>	QU629_RS09550	Heat shock protein 60 kDa family chaperone	2.269502812



<i>fliF</i>	QU629_RS11625	Flagellar M-ring protein FliF	2.23542324
QU629_RS04535	QU629_RS04535	Multidrug efflux system MdtABC-TolC	2.227656893
<i>fhuA</i>	QU629_RS07035	Ferric hydroxamate outer membrane receptor	2.225299345
<i>soxR</i>	QU629_RS09255	Redox-sensitive transcriptional activator SoxR	2.220866651
QU629_RS04590	QU629_RS04590	Methyl-accepting chemotaxis sensor protein STM3216	2.188933377
QU629_RS13885	QU629_RS13885	ABC transporter, substrate-binding protein	2.174863957
QU629_RS01545	QU629_RS01545	HTH-type transcriptional repressor ComR	2.151297978
QU629_RS13920	QU629_RS13920	5-methylthioribose ABC transporter	2.110830149
<i>speG</i>	QU629_RS00075	Spermidine N1-acetyltransferase	2.097820856
QU629_RS01215	QU629_RS01215	Outer membrane protein V	2.052102872
<i>zntR</i>	QU629_RS21395	Transcriptional regulator ZntR	2.025948794
<i>miaE</i>	QU629_RS13115	Phospholipid ABC transporter permease protein MiaE	2.019748472
<i>norR</i>	QU629_RS21645	Anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator NorR	1.956850227
QU629_RS13880	QU629_RS13880	ABC transporter, permease protein	1.944554792
<i>msrA</i>	QU629_RS12290	Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase	1.921574941
QU629_RS07965	QU629_RS07965	Inner membrane protein YiaH	1.919182969
QU629_RS04235	QU629_RS04235	Cytidine deaminase	1.909849644
<i>entF</i>	QU629_RS14010	Enterobactin synthetase component F	1.907402469
QU629_RS02940	QU629_RS02940	Sugar phosphatase YbiV	1.893464894
QU629_RS07505	QU629_RS07505	Putative outer membrane lipoprotein	1.846972786
<i>Dps</i>	QU629_RS03040	Threonine/homoserine exporter RhtA	1.828070961
QU629_RS12260	QU629_RS12260	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	1.816743881
<i>Lon</i>	QU629_RS17145	ATP-dependent protease La	1.813940307
<i>nfuA</i>	QU629_RS09805	[4Fe-4S] cluster carrier protein NfuA	1.813561426
QU629_RS02780	QU629_RS02780	Multidrug efflux pump MdfA/Cmr (of MFS type)	1.808931862
QU629_RS01120	QU629_RS01120	Transcriptional regulator, AraC family	1.789350924
<i>cydX</i>	QU629_RS19630	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit X	1.789001509
QU629_RS20550	QU629_RS20550	Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator	1.788678098
<i>cysC</i>	QU629_RS15185	Adenylylsulfate kinase	1.771140639
<i>cysD</i>	QU629_RS15175	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	1.762786377
QU629_RS04970	QU629_RS04970	Acetolactate synthase, catabolic	1.746203682
<i>meta</i>	QU629_RS08890	Homoserine O-succinyltransferase	1.740870021

<i>creB</i>	QU629_RS07665	Response regulator CreB of two-component signal transduction system CreBC	1.740726098
QU629_RS20380	QU629_RS20380	Transcriptional regulator, AraC family	1.736220551
<i>Asd</i>	QU629_RS09645	Phosphatidylserine decarboxylase	1.735830019
<i>pabC</i>	QU629_RS01620	Aminodeoxychorismate lyase	1.725378755
QU629_RS00565	QU629_RS00565	Major outer membrane lipoprotein Lpp	1.71784913
QU629_RS09180	QU629_RS09180	Periplasmic chorismate mutase I precursor	1.714975046
<i>flgE</i>	QU629_RS11485	Flagellar hook protein FlgE	1.709971957
QU629_RS14735	QU629_RS14735	DNA-binding transcriptional dual regulator	1.7074971
<i>msrP</i>	QU629_RS12880	Protein-methionine-sulfoxide reductase catalytic subunit MsrP	1.701584
<i>nrdG</i>	QU629_RS12430	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic)	1.694793611
QU629_RS02335	QU629_RS02335	L-rhamnose operon transcriptional activator RhaR	1.693999219
<i>traT</i>	QU629_RS15625	IncF plasmid conjugative transfer surface	1.684327426
QU629_RS00970	QU629_RS00970	Organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator	1.674632279
QU629_RS10875	QU629_RS10875	Uncharacterized MFS-type transporter	1.668439329
QU629_RS20095	QU629_RS20095	Transcriptional regulator YafC	1.658747414
<i>bamC</i>	QU629_RS11030	Outer membrane beta-barrel assembly	1.657655707
<i>mar</i>	QU629_RS22005	Multiple antibiotic	1.656692314
<i>gstA</i>	QU629_RS00400	Glutathione S-transferase	1.655533229
<i>gapA</i>	QU629_RS00935	NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.655493719
QU629_RS12705	QU629_RS12705	Two-component system sensor histidine kinase	1.655165227
QU629_RS04295	QU629_RS04295	Uncharacterized oxidoreductase YohF	1.642707348
<i>thiB</i>	QU629_RS07400	Thiamin ABC transporter, substrate-binding component	1.639364975
<i>fepC</i>	QU629_RS14005	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC	1.63889561
<i>trxC</i>	QU629_RS10450	Thioredoxin 2	1.61089708
QU629_RS10915	QU629_RS10915	Two-component transcriptional response regulator	1.601550273
<i>soxS</i>	QU629_RS09250	DNA-binding transcriptional dual regulator SoxS	1.597439856
QU629_RS13940	QU629_RS13940	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase	1.590944596
<i>flil</i>	QU629_RS11640	Flagellum-specific ATP synthase Flil	1.585194449
QU629_RS15145	QU629_RS15145	Glycine cleavage system transcriptional activator GcvA	1.581224701
<i>exuR</i>	QU629_RS13490	Hexuronate utilization operon transcriptional repressor	1.570989691
<i>nrdD</i>	QU629_RS12435	Ribonucleotide reductase of class III (anaerobic)	1.570021361
QU629_RS17210	QU629_RS17210	2-dehydropantoate 2-reductase	1.552598599

QU629_RS21270	QU629_RS21270	Thiamin-phosphate pyrophosphorylase	1.551439082
<i>sucA</i>	QU629_RS19660	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	1.535027203
<i>kdpC</i>	QU629_RS19745	Potassium-transporting ATPase C chain	1.534829486
QU629_RS11440	QU629_RS11440	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	1.532235729
<i>ytfE</i>	QU629_RS12235	Repair of Iron Centers di-iron protein	1.531979055
<i>cysG</i>	QU629_RS21185	Precorrin-2 oxidase	1.529050437
QU629_RS08385	QU629_RS08385	Aldo/keto reductase	1.528716452
QU629_RS06155	QU629_RS06155	Benzoate transport protein	1.522720281
<i>ydfG</i>	QU629_RS00045	NADP-dependent 3-hydroxy acid dehydrogenase YdfG	1.520663086
<i>greA</i>	QU629_RS13180	Transcription elongation factor GreA	1.519313717
<i>adhP</i>	QU629_RS05655	Alcohol dehydrogenase	1.502003915
<i>iscR</i>	QU629_RS10635	Iron-sulfur cluster regulator IscR	1.49946484
<i>htpG</i>	QU629_RS16840	Chaperone protein HtpG	1.497113218
<i>mutM</i>	QU629_RS08215	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	1.496768603
<i>bamE</i>	QU629_RS11775	Outer membrane beta-barrel assembly protein BamE	1.495074462
<i>mtnA</i>	QU629_RS13900	S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase	1.494959202
<i>slyA</i>	QU629_RS00430	Transcriptional regulator SlyA	1.49260356
<i>efeU</i>	QU629_RS01960	Ferrous iron transport permease EfeU	1.489949209
QU629_RS03245	QU629_RS03245	Oxidoreductase	1.482462237
<i>zntB</i>	QU629_RS06380	Zinc transport protein ZntB	1.480373168
<i>yieE</i>	QU629_RS04140	Transcriptional regulator YeiE	1.475194744
QU629_RS20655	QU629_RS20655	4-carboxymuconolactone decarboxylase domain	1.474496303
QU629_RS00350	QU629_RS00350	Inner membrane protein YdgK	1.459419173
<i>fhuB</i>	QU629_RS07020	Ferric hydroxamate ABC transporter	1.45772672
QU629_RS20650	QU629_RS20650	Transcriptional regulator, GntR family domain	1.455828195
QU629_RS12255	QU629_RS12255	Redox-sensing transcriptional regulator QorR	1.445615559
<i>roba</i>	QU629_RS07675	DNA-binding transcriptional dual regulator	1.441931939
<i>Mqo</i>	QU629_RS04000	Malate:quinone oxidoreductase	1.435871899
<i>bamD</i>	QU629_RS12025	Outer membrane beta-barrel assembly	1.421175866
QU629_RS16085	QU629_RS16085	Uncharacterized inner membrane transporter YedA	1.42101358
QU629_RS15240	QU629_RS15240	Transcriptional regulator STM2912	1.418904667
<i>efeB</i>	QU629_RS01950	Ferrous iron transport peroxidase EfeB	1.414031183
<i>dapA</i>	QU629_RS11025	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	1.405706111

QU629_RS15790	QU629_RS15790	NAD(P)H-flavin oxidoreductase	1.398454202
<i>rsxC</i>	QU629_RS00365	Electron transport complex protein	1.395352513
QU629_RS17440	QU629_RS17440	TonB-dependent hemin	1.388579314
<i>Tpx</i>	QU629_RS06430	Thiol peroxidase	1.379568615
QU629_RS10870	QU629_RS10870	Hypothetical ABC transport system, periplasmic component	1.379316789
QU629_RS15490	QU629_RS15490	IncF plasmid conjugative transfer pilus	1.375076236
<i>nrdE</i>	QU629_RS11310	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic)	1.374452611
QU629_RS00800	QU629_RS00800	Membrane-bound metal-dependent hydrolase YdjM	1.374137402
<i>fhuC</i>	QU629_RS07030	Ferric hydroxamate ABC transporter	1.356843446
<i>tolA</i>	QU629_RS19605	Methyl-accepting chemotaxis sensor	1.348709229
<i>purB</i>	QU629_RS01415	Adenylosuccinate lyase	1.339446354
QU629_RS04530	QU629_RS04530	Multidrug efflux system MdtABC-TolC	1.337128687
QU629_RS13455	QU629_RS13455	Inner membrane protein YqjK	1.332792943
QU629_RS10280	QU629_RS10280	Trehalase	1.331782116
QU629_RS07850	QU629_RS07850	YoeB toxin protein	1.314454386
QU629_RS03530	QU629_RS03530	Long-chain fatty acid transport protein	1.278786374
QU629_RS20660	QU629_RS20660	Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein	1.270518229
<i>gshB</i>	QU629_RS05205	Glutathione synthetase	1.263964223
QU629_RS06505	QU629_RS06505	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	1.262367987
<i>ruvC</i>	QU629_RS16195	Crossover junction endodeoxyribonuclease RuvC	1.26067089
<i>copa</i>	QU629_RS16800	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase	1.25361867
QU629_RS15745	QU629_RS15745	Transcriptional regulator, HxlR family	1.247181002
<i>psiF</i>	QU629_RS17325	Phosphate starvation-inducible protein PsiF	1.240993855
<i>dinF</i>	QU629_RS09095	DNA-damage-inducible protein F	1.216262938
QU629_RS10300	QU629_RS10300	Transcriptional regulator YhjC, LysR family	1.215426947
<i>cysG</i>	QU629_RS15170	Precorrin-2 oxidase	1.189158945
QU629_RS07595	QU629_RS07595	L-Proline/Glycine betaine transporter ProP	1.183436301
<i>rsxD</i>	QU629_RS00370	Electron transport complex protein	1.15338298
QU629_RS05370	QU629_RS05370	Transcriptional regulator, RpiR family	1.123071369
QU629_RS03005	QU629_RS03005	Inner-membrane proton/drug antiporter (MSF type) of tripartite multidrug efflux system	-1.431833061
QU629_RS05070	QU629_RS05070	Tricarboxylate transport transcriptional regulator TctD	-1.432239508
<i>IdtB</i>	QU629_RS02970	Biosintesis de la pared celular	-1.432495145

QU629_RS12400	QU629_RS12400	D-glucosamine-6-phosphate ammonia-lyase related protein	-1.44197416
<i>wzzE</i>	QU629_RS18290	Lipopolysaccharide biosynthesis protein	-1.445694612
<i>phoC</i>	QU629_RS00900	Acid phosphatase	-1.447925114
QU629_RS03505	QU629_RS03505	Putative inner membrane protein	-1.451795838
QU629_RS05525	QU629_RS05525	Sensory box histidine kinase/response regulator	-1.483223108
QU629_RS17030	QU629_RS17030	Dihydrolipoamide dehydrogenase of acetoin dehydrogenase	-1.486765254
<i>glpK</i>	QU629_RS17865	Glycerol kinase	-1.493567295
QU629_RS05685	QU629_RS05685	Aerotaxis sensor receptor protein	-1.495259903
QU629_RS09515	QU629_RS09515	Cytochrome c-type biogenesis protein DsbD	-1.496095358
<i>dppA</i>	QU629_RS07825	Dipeptide ABC transporter	-1.503692536
<i>Tdh</i>	QU629_RS08130	L-threonine 3-dehydrogenase	-1.5169583
QU629_RS09205	QU629_RS09205	Inositol-1-monophosphatase	-1.519010931
<i>mtfA</i>	QU629_RS14640	Protein MtfA	-1.534312182
<i>Wzb</i>	QU629_RS14215	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	-1.550901318
QU629_RS04920	QU629_RS04920	Glutathione S-transferase	-1.56542489
<i>phoH</i>	QU629_RS01945	Phosphate starvation-inducible protein PhoH,	-1.570205304
<i>flgC</i>	QU629_RS01745	Flagellar basal-body rod protein FlgC	-1.602017262
QU629_RS04745	QU629_RS04745	ADP-ribose pyrophosphatase	-1.607036085
QU629_RS04290	QU629_RS04290	Small membrane protein YohP	-1.610805117
<i>argG</i>	QU629_RS13220	Argininosuccinate synthase	-1.612336633
<i>por</i>	QU629_RS17260	Phosphate regulon sensor protein PhoR	-1.616643897
<i>ilvC</i>	QU629_RS18215	Ketol-acid reductoisomerase	-1.623177171
<i>cydB</i>	QU629_RS06105	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II	-1.624335615
QU629_RS04405	QU629_RS04405	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein MalK	-1.626185543
<i>ydck</i>	QU629_RS06185	Putative transferase clustered with tellurite resistance proteins TehA	-1.628928903
QU629_RS03515	QU629_RS03515	Bactoprenol-linked glucose translocase	-1.630675125
QU629_RS18700	QU629_RS18700	Putative membrane protein YchH	-1.635125855
QU629_RS20525	QU629_RS20525	Methyl-accepting chemotaxis protein I	-1.645732355
QU629_RS05060	QU629_RS05060	Putative inner membrane protein YqgA	-1.647335008
<i>argH</i>	QU629_RS17755	Argininosuccinate lyase	-1.658708725
<i>gntT</i>	QU629_RS09810	High-affinity gluconate transporter GntT	-1.667642771
<i>tamA</i>	QU629_RS12295	Outer membrane component of TAM transport system	-1.675223743

<i>pphA</i>	QU629_RS16320	Serine/threonine protein phosphatase	-1.682083473
QU629_RS07900	QU629_RS07900	2-ketogluconate transporter	-1.68378307
<i>fumA</i>	QU629_RS00280	Fumarate hydratase class I	-1.708699836
<i>flgB</i>	QU629_RS01750	Flagellar basal-body rod protein FlgB	-1.71125348
<i>potC</i>	QU629_RS01455	Spermidine/putrescine import ABC transporter permease protein	-1.715178698
QU629_RS18475	QU629_RS18475	Transcriptional activator MetR	-1.716865178
<i>cspE</i>	QU629_RS13690	Cold shock protein of CSP family	-1.721791012
QU629_RS13575	QU629_RS13575	Glutamate/aspartate ABC transporter	-1.725961069
<i>paoA</i>	QU629_RS17470	Periplasmic aromatic aldehyde oxidoreductase	-1.728590706
<i>traF</i>	QU629_RS09110	Putative outer membrane or exported protein	-1.729011309
<i>argB</i>	QU629_RS17760	N-acetylglutamate kinase	-1.731006577
QU629_RS14575	QU629_RS14575	FMN-dependent NADH-azoreductase	-1.731662485
<i>malQ</i>	QU629_RS09815	4-alpha-glucanotransferase (amylomaltase)	-1.733358249
<i>potD</i>	QU629_RS01460	Spermidine/putrescine import ABC transporter substrate-binding protein	-1.736430453
QU629_RS14660	QU629_RS14660	Transcriptional repressor of the lac operon	-1.741096108
<i>fadI</i>	QU629_RS03535	3-ketoacyl-CoA thiolase	-1.748063515
<i>hutX</i>	QU629_RS17455	Putative heme iron utilization protein	-1.751100664
<i>Gmd</i>	QU629_RS14255	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-1.754533888
QU629_RS20625	QU629_RS20625	Uncharacterized GGDEF domain protein YneF	-1.769383908
QU629_RS21285	QU629_RS21285	NADH pyrophosphatase	-1.773411102
<i>wcaE</i>	QU629_RS14245	Colanic acid biosynthesis glycosyl transferase	-1.777870974
QU629_RS17355	QU629_RS17355	Inner membrane protein YaiY	-1.792920846
<i>patD</i>	QU629_RS06090	4-aminobutyraldehyde dehydrogenase	-1.798242443
QU629_RS09325	QU629_RS09325	Response regulator protein	-1.807005895
<i>ycgZ</i>	QU629_RS18920	Probable two-component-system connector protein YcgZ	-1.824938366
QU629_RS09275	QU629_RS09275	Myo-inositol 2-dehydrogenase	-1.830437116
<i>glnK</i>	QU629_RS17085	Nitrogen regulatory protein P-II, GlnK	-1.839943751
QU629_RS04880	QU629_RS04880	Uncharacterized oxidoreductase YghA	-1.849772602
QU629_RS19210	QU629_RS19210	Methyl-accepting chemotaxis protein II	-1.852752332
QU629_RS10430	QU629_RS10430	Putative outer membrane lipoprotein	-1.8538553
<i>ompW</i>	QU629_RS06660	Outer membrane protein W precursor	-1.857381108
<i>malP</i>	QU629_RS09820	Maltodextrin phosphorylase	-1.863154589

QU629_RS09510	QU629_RS09510	Transcriptional regulator YjdC	-1.865446142
<i>aaeR</i>	QU629_RS12925	Transcriptional regulator AaeR, LysR family	-1.871310514
<i>rhaS</i>	QU629_RS17980	Predicted L-rhamnose ABC transporter	-1.888997034
<i>yjfF</i>	QU629_RS12330	Galactofuranose ABC transporter, permease protein 2	-1.898512846
QU629_RS01345	QU629_RS01345	Methyl-accepting chemotaxis sensor/transducer protein	-1.900697796
QU629_RS05565	QU629_RS05565	Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor signals to flagellar motor components CheY	-1.948434679
QU629_RS14210	QU629_RS14210	Low molecular weight protein-tyrosine-phosphatase	-1.949472838
QU629_RS08410	QU629_RS08410	Uncharacterized zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein YbdR	-1.957149195
QU629_RS04580	QU629_RS04580	Putrescine aminotransferase	-1.961025883
<i>gltJ</i>	QU629_RS13580	Glutamate/aspartate ABC transporter	-1.966386124
QU629_RS11750	QU629_RS11750	Type I secretion membrane fusion protein, HlyD family	-1.970183138
<i>artJ</i>	QU629_RS02690	Arginine ABC transporter, substrate-binding protein ArtJ	-1.970916778
QU629_RS18940	QU629_RS18940	Flagellin FlhC	-1.978717959
QU629_RS05705	QU629_RS05705	Thiamine pyrophosphate-requiring protein PA2108	-1.981371229
<i>argC</i>	QU629_RS17765	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	-1.98977371
<i>garD</i>	QU629_RS13395	D-galactarate dehydratase	-1.993098328
<i>putP</i>	QU629_RS01975	Transcriptional repressor of PutA and PutP	-1.994228792
QU629_RS03000	QU629_RS03000	Efflux transport system, outer membrane factor (OMF) lipoprotein	-1.995455362
<i>ycaC</i>	QU629_RS09115	Nicotinamidase family protein YcaC	-2.021010283
QU629_RS01920	QU629_RS01920	Anaerobic respiratory reductase chaperone	-2.032039357
QU629_RS17940	QU629_RS17940	Superoxide dismutase	-2.038004916
QU629_RS21775	QU629_RS21775	PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIC component	-2.056185285
QU629_RS17860	QU629_RS17860	Glycerol kinase	-2.065007828
QU629_RS00660	QU629_RS00660	Arginine ABC transporter, substrate-binding protein ArtJ	-2.068273119
QU629_RS21245	QU629_RS21245	Cytochrome c-type biogenesis protein DsbD	-2.073232205
QU629_RS08045	QU629_RS08045	PTS system, mannitol-specific IIC component	-2.07987993
<i>bcsQ</i>	QU629_RS10365	Cellulose biosynthesis protein BcsQ	-2.098319477
<i>pstC</i>	QU629_RS08715	Phosphate ABC transporter, permease protein PstC	-2.101956387
<i>wcaF</i>	QU629_RS14250	Colanic acid biosynthesis acetyltransferase	-2.110449281
<i>traB</i>	QU629_RS15510	IncF plasmid conjugative transfer pilus assembly protein	-2.128092752
<i>flhD</i>	QU629_RS11700	Flagellar transcriptional activator FlhD	-2.135564878
QU629_RS14935	QU629_RS14935	4-deoxy-L-threo-5-hexosulose-uronate ketol-isomerase	-2.170501611

<i>potA</i>	QU629_RS01445	Spermidine/putrescine import ABC transporter ATP-binding protein PotA	-2.17773531
<i>srlB</i>	QU629_RS21770	PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIB component	-2.185982776
<i>rhaD</i>	QU629_RS17975	Rhamnulose-1-phosphate aldolase	-2.198290451
QU629_RS09235	QU629_RS09235	ABC transporter, permease protein 2	-2.223986629
QU629_RS06100	QU629_RS06100	DNA-binding transcriptional regulator, MocR family	-2.231251675
QU629_RS02065	QU629_RS02065	Diguanylate cyclase	-2.239906863
QU629_RS19335	QU629_RS19335	Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	-2.254945045
<i>ugpE</i>	QU629_RS09905	Glycerol-3-phosphate ABC transporter	-2.261986789
<i>ppsA</i>	QU629_RS00655	Phosphoenolpyruvate synthase	-2.265251151
<i>fadA</i>	QU629_RS22040	3-ketoacyl-CoA thiolase	-2.267040765
QU629_RS21135	QU629_RS21135	Para-aminobenzoate synthase	-2.267736422
QU629_RS04720	QU629_RS04720	TRAP-type transport system,	-2.272814086
<i>argF</i>	QU629_RS12475	Ornithine carbamoyltransferase	-2.278895773
<i>rhaR</i>	QU629_RS17955	L-rhamnose operon transcriptional activator RhaR	-2.313088953
QU629_RS18495	QU629_RS18495	ABC transporter, ATP-binding protein	-2.315924004
QU629_RS21250	QU629_RS21250	2-iminoacetate synthase	-2.320671276
<i>malZ</i>	QU629_RS21000	Maltodextrin glucosidase	-2.339760341
<i>gltK</i>	QU629_RS13585	Glutamate/aspartate ABC transporter	-2.341815593
<i>ompF</i>	QU629_RS02370	Outer membrane porin OmpF	-2.348623702
QU629_RS20750	QU629_RS20750	ABC transporter, permease protein	-2.356044579
<i>ugpA</i>	QU629_RS09910	Glycerol-3-phosphate ABC transporter	-2.359540275
QU629_RS02950	QU629_RS02950	Transcriptional regulator, LacI family	-2.360108668
QU629_RS09230	QU629_RS09230	ABC transporter, permease protein	-2.364774563
QU629_RS02985	QU629_RS02985	PTS system, cellobiose-specific IIC component	-2.382700178
QU629_RS20615	QU629_RS20615	Glutaminase	-2.387775421
<i>mgIC</i>	QU629_RS04210	Galactose/methyl galactoside ABC transporter	-2.390588789
QU629_RS19205	QU629_RS19205	Sigma-fimbriae tip adhesin	-2.410485582
QU629_RS15345	QU629_RS15345	Outer membrane porin	-2.42559093
QU629_RS09215	QU629_RS09215	Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily III	-2.429092323
<i>uspG</i>	QU629_RS13740	Universal stress protein G	-2.433261418
<i>adhP</i>	QU629_RS20250	Alcohol dehydrogenase	-2.436018228
<i>ytfT</i>	QU629_RS12325	Galactofuranose ABC transporter	-2.437409319



<i>phoB</i>	QU629_RS17265	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	-2.464567457
QU629_RS12265	QU629_RS12265	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase	-2.491076905
QU629_RS08015	QU629_RS08015	Periplasmic alpha-amylase	-2.501565877
QU629_RS10285	QU629_RS10285	Putative inner membrane protein	-2.585834068
<i>aldA</i>	QU629_RS06280	Aldehyde dehydrogenase A	-2.593853124
QU629_RS11740	QU629_RS11740	Type I secretion system, outer membrane component LapE	-2.610692629
QU629_RS09210	QU629_RS09210	Transcriptional regulator	-2.628336257
QU629_RS09225	QU629_RS09225	ABC transporter, substrate-binding protein	-2.644869925
QU629_RS09370	QU629_RS09370	Putative aldolase Z5687	-2.649073561
<i>sstT</i>	QU629_RS13510	Serine/threonine:Na <sup>+</sup> symporter SstT	-2.650740268
QU629_RS09365	QU629_RS09365	PfkB family carbohydrate kinase Z5686	-2.655168753
QU629_RS21960	QU629_RS21960	ABC transporter, ATP-binding protein	-2.660521364
QU629_RS18490	QU629_RS18490	Ferric iron ABC transporter, permease protein	-2.711792917
<i>argA</i>	QU629_RS15105	N-acetylglutamate synthase	-2.713661422
<i>csiE</i>	QU629_RS10610	Stationary phase inducible protein CsiE	-2.718686595
<i>Acs</i>	QU629_RS09290	Acetyl-CoA synthetase	-2.772951223
QU629_RS06260	QU629_RS06260	RcnR-like protein clustered with cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	-2.779781485
QU629_RS19200	QU629_RS19200	Sigma-fimbriae usher protein	-2.81370185
QU629_RS20745	QU629_RS20745	ABC transporter, substrate-binding protein	-2.81932441
<i>ugpB</i>	QU629_RS09915	Glycerol-3-phosphate ABC transporter	-2.842658717
<i>malT</i>	QU629_RS09825	Transcriptional activator of maltose regulon	-2.860552946
<i>potB</i>	QU629_RS01450	Spermidine/putrescine import ABC transporter permease protein PotB	-2.867483145
QU629_RS19130	QU629_RS19130	L-arabinose ABC transporter, ATP-binding protein AraG	-2.872784579
<i>pstS</i>	QU629_RS08720	Phosphate ABC transporter, substrate-binding protein PstS	-2.882402586
QU629_RS06225	QU629_RS06225	Putative insecticidal toxin complex	-2.9022465
<i>pckA</i>	QU629_RS09755	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	-2.905022396
QU629_RS08560	QU629_RS08560	Putative transport protein YidE	-2.921705908
<i>actP</i>	QU629_RS09280	Acetate permease ActP	-2.990762449
QU629_RS04715	QU629_RS04715	TRAP-type C4-dicarboxylate transport system	-3.023100505
QU629_RS12165	QU629_RS12165	Methyl-accepting chemotaxis protein	-3.039949425
QU629_RS09380	QU629_RS09380	ABC transport system	-3.097567085
QU629_RS10335	QU629_RS10335	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -dicarboxylate symporter	-3.112625944

<i>ytfR</i>	QU629_RS12320	Galactofuranose ABC transporter, permease	-3.120897644
<i>phoE</i>	QU629_RS17620	Outer membrane porin PhoE	-3.148966728
QU629_RS19190	QU629_RS19190	Sigma-fimbriae uncharacterized paralogous subunit	-3.160363249
<i>malF</i>	QU629_RS09045	Maltodextrin ABC transporter, permease protein MdxF	-3.179491339
<i>malE</i>	QU629_RS09050	Maltodextrin ABC transporter, substrate-binding protein MdxE	-3.193786666
QU629_RS15670	QU629_RS15670	Predicted transcription regulator, contains HTH domain	-3.208283312
QU629_RS21965	QU629_RS21965	3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase	-3.220107924
<i>malK</i>	QU629_RS09055	Maltose/maltodextrin transport ATP-binding protein MalK	-3.242181458
<i>galS</i>	QU629_RS04195	Mgl repressor and galactose	-3.255010962
<i>mglB</i>	QU629_RS04200	Galactose/methyl galactoside ABC transporter,	-3.256658416
<i>mglA</i>	QU629_RS04205	Galactose/methyl galactoside ABC transporter	-3.273495988
<i>poa</i>	QU629_RS17330	Alkaline phosphatase	-3.310009815
QU629_RS09220	QU629_RS09220	ABC transporter, ATP-binding protein	-3.312693339
QU629_RS19195	QU629_RS19195	Sigma-fimbriae chaperone protein	-3.323961172
QU629_RS09385	QU629_RS09385	ABC transport system, permease protein Z5690	-3.335360399
QU629_RS09390	QU629_RS09390	ABC transport system, ATP-binding protein	-3.369767728
QU629_RS09060	QU629_RS09060	Maltoporin (maltose/maltodextrin high-affinity receptor	-3.415332548
<i>fadE</i>	QU629_RS17675	Acyl-coenzyme A dehydrogenase FadE	-3.449076598
QU629_RS21975	QU629_RS21975	N-Acetyl-D-glucosamine ABC transport system	-3.527940276
<i>fadB</i>	QU629_RS22045	Enoyl-CoA hydratase	-3.583000353
<i>phnH</i>	QU629_RS09410	Alpha-D-ribose 1-methylphosphonate 5-triphosphate synthase subunit PhnH	-3.729976056
<i>ytfQ</i>	QU629_RS12315	Galactofuranose ABC transporter, ATP-binding protein	-3.87645617
QU629_RS00010	QU629_RS00010	Rhodanese-related sulfurtransferase	-3.927718162
QU629_RS04710	QU629_RS04710	4,5-DOPA dioxygenase extradiol	-4.000897945
<i>phnF</i>	QU629_RS09415	Transcriptional regulator PhnF	-4.038987359

Anexo 2. Principales genes diferencialmente expresados en *K. cowanii* Ch1 durante la interacción con *S. rolfsii* en presencia de COV's.

Gene	ID	Description	Log2FoldChange
<i>Fes</i>	QU629_RS14015	Enterobactin esterase	3.634468125
QU629_RS02930	QU629_RS02930	Pyruvate formate-lyase activating enzyme	3.397378079

QU629_RS02935	QU629_RS02935	Pyruvate formate-lyase (EC 2.3.1.54)	3.236784358
<i>ibpB</i>	QU629_RS08580	16 kDa heat shock protein B	3.218758972
<i>gatY</i>	QU629_RS13385	Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase GatY	2.923371661
<i>garD</i>	QU629_RS13390	D-galactarate dehydratase	2.897074955
<i>fepB</i>	QU629_RS13980	Ferric enterobactin-binding periplasmic protein FepB	2.89548868
<i>flhA</i>	QU629_RS11585	Flagellar biosynthesis protein FlhA	2.84693832
<i>ibpA</i>	QU629_RS08585	16 kDa heat shock protein A	2.79349997
<i>katG</i>	QU629_RS20195	Catalase-peroxidase KatG	2.736845082
QU629_RS02135	QU629_RS02135	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	2.580207016
QU629_RS13925	QU629_RS13925	Hydroxycarboxylate dehydrogenase (NADP+)	2.453291239
<i>efeU</i>	QU629_RS01960	Ferrous iron transport permease EfeU	2.372193453
QU629_RS13915	QU629_RS13915	5-methylthioribose ABC transporter, permease protein	2.329018541
QU629_RS02605	QU629_RS02605	Virulence factor VirK	2.288018756
<i>fabF</i>	QU629_RS20110	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASII	2.282064347
QU629_RS02130	QU629_RS02130	Acyl carrier protein	2.262322307
<i>Nac</i>	QU629_RS14595	Nitrogen assimilation regulatory protein Nac	2.246135855
<i>gatZ</i>	QU629_RS13380	Tagatose-6-phosphate kinase GatZ	2.222163364
QU629_RS13910	QU629_RS13910	5-methylthioribose ABC transporter, substrate-binding protein	2.218596734
QU629_RS16935	QU629_RS16935	Methionine ABC transporter substrate-binding protein	2.20602317
QU629_RS21570	QU629_RS21570	Antibiotic biosynthesis monooxygenase	2.175185941
<i>flgE</i>	QU629_RS11480	Flagellar hook protein	2.120121576
QU629_RS10705	QU629_RS10705	PTS system, maltose and glucose-specific IIC component	2.09028697
QU629_RS16940	QU629_RS16940	Methionine ABC transporter ATP-binding protein	2.089074811
QU629_RS14020	QU629_RS14020	TonB-dependent receptor; Outer membrane receptor for ferric enterobactin and colicins B, D	2.048495592
QU629_RS11420	QU629_RS11420	ABC transporter, ATP-binding protein	2.039953724
<i>trxC</i>	QU629_RS10450	Thioredoxin 2	2.006859214
QU629_RS13920	QU629_RS13920	5-methylthioribose ABC transporter	1.909576163
<i>mliA</i>	QU629_RS03525	Outer-membrane-phospholipid-binding lipoprotein MliA	1.906214479
<i>queG</i>	QU629_RS12045	Epoxyqueuosine reductase	1.848745649
<i>fhuF</i>	QU629_RS20585	Ferric reductase	1.838637761
QU629_RS11415	QU629_RS11415	Ferric iron ABC transporter	1.833960795
<i>flgH</i>	QU629_RS11495	Flagellar L-ring protein FlgH	1.83014165
QU629_RS20365	QU629_RS20365	Iron compound ABC transporter, permease protein	1.817662103
QU629_RS16930	QU629_RS16930	2-Oxobutyrate oxidase, putative	1.790803044
<i>entS</i>	QU629_RS13985	Enterobactin exporter EntS	1.780319284
QU629_RS10700	QU629_RS10700	Maltose-6'-phosphate glucosidase	1.752457258
QU629_RS05045	QU629_RS05045	Polyketide synthase modules and related proteins	1.751705058
<i>flgC</i>	QU629_RS11475	Flagellar basal-body rod modification protein	1.744778872
QU629_RS21790	QU629_RS21790	Zinc ABC transporter	1.740741877

QU629_RS21795	QU629_RS21795	Zinc ABC transporter	1.718010506
<i>efeO</i>	QU629_RS01955	Ferrous iron transport periplasmic protein EfeO	1.657991142
QU629_RS13885	QU629_RS13885	ABC transporter	1.585032688
QU629_RS02125	QU629_RS02125	Putative aminomethyltransferase	1.569963045
QU629_RS13895	QU629_RS13895	S-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase	1.562646139
<i>gntX</i>	QU629_RS09800	Competence protein F homolog	1.557357797
<i>Bfd</i>	QU629_RS21555	Bacterioferritin-associated ferredoxin	1.551490499
QU629_RS20385	QU629_RS20385	Ferrichrome-iron receptor	1.548242669
<i>exbB</i>	QU629_RS04865	TonB-ExbBD energy transducing system	1.547372024
<i>fepD</i>	QU629_RS13995	Ferric enterobactin transport system permease protein FepD	1.509803716
QU629_RS11530	QU629_RS11530	Flagellar transcriptional activator FlhD	1.509171296
<i>fhuA</i>	QU629_RS07035	Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA	1.502604411
<i>mgrB</i>	QU629_RS16380	PhoP/PhoQ regulator MgrB	1.498074925
<i>cysD</i>	QU629_RS15175	Sulfate adenylyltransferase subunit 2	1.496869378
<i>modA</i>	QU629_RS19485	Molybdenum ABC transporter	1.47394618
QU629_RS20360	QU629_RS20360	Iron compound ABC transporter	1.472482678
<i>znuC</i>	QU629_RS16225	Zinc ABC transporter	1.446075637
QU629_RS16740	QU629_RS16740	Uncharacterized metabolite ABC transporter in Enterobacteriaceae	1.441358506
QU629_RS16945	QU629_RS16945	Methionine ABC transporter permease protein	1.440116137
QU629_RS03965	QU629_RS03965	Phosphotransferase RcsD	1.399293946
QU629_RS20030	QU629_RS20030	L-serine dehydratase, beta subunit	1.37786936
<i>hemH</i>	QU629_RS16830	Ferrochelataase, protoheme ferro-lyase	1.375733027
QU629_RS02335	QU629_RS02335	Alkanesulfonate ABC transporter substrate-binding protein SsuA	1.369885256
<i>nrdI</i>	QU629_RS11315	Ribonucleotide reduction protein	1.356769139
<i>traT</i>	QU629_RS15625	IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein TraT	1.332364041
<i>zinT</i>	QU629_RS17465	Metal-binding protein	1.322624585
<i>exbD</i>	QU629_RS04870	TonB-ExbBD energy transducing system	1.317687019
QU629_RS02940	QU629_RS02940	Sugar phosphatase YbiV	1.311707229
QU629_RS17860	QU629_RS17860	Glycerol kinase	1.289446287
<i>xylF</i>	QU629_RS07990	D-xylose ABC transporter	1.289272428
<i>modB</i>	QU629_RS19480	Molybdenum ABC transporter permease protein ModB	1.274149005
<i>feoA</i>	QU629_RS09770	Ferrous iron transporter-associated protein	1.271800129
QU629_RS05185	QU629_RS05185	Twitching motility protein	1.2699509
QU629_RS21800	QU629_RS21800	Nicotinamide-nucleotide amidase	1.2627532
<i>cysN</i>	QU629_RS15180	Sulfate adenylyltransferase subunit 1	1.256047609
QU629_RS07995	QU629_RS07995	D-xylose ABC transporter	1.215545036
<i>thiG</i>	QU629_RS21260	Thiazole synthase	1.213475875
QU629_RS19045	QU629_RS19045	BarA-associated response regulator UvrY	1.137501261
QU629_RS06505	QU629_RS06505	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase	1.128844919

<i>traT</i>	QU629_RS07165	IncF plasmid conjugative transfer surface exclusion protein TraT	1.043258368
QU629_RS04920	QU629_RS04920	Glutathione S-transferase	-1.137461364
<i>lpxP</i>	QU629_RS00620	Lipid A biosynthesis palmitoleoyltransferase	-1.141768336
QU629_RS05825	QU629_RS05825	Tellurium resistance protein TerD	-1.15765179
<i>puuE</i>	QU629_RS20045	Uricase (urate oxidase)	-1.218831477
<i>hutX</i>	QU629_RS17455	Putative heme iron utilization protein	-1.236500297
QU629_RS22035	QU629_RS22035	3-ketoacyl-CoA thiolase	-1.258519591
QU629_RS11755	QU629_RS11755	tmRNA-binding protein SmpB	-1.313288727
QU629_RS20050	QU629_RS20050	Transcriptional regulator, GntR family	-1.336443374
QU629_RS05925	QU629_RS05925	Nitrate ABC transporter, substrate-binding protein	-1.391599029
QU629_RS15670	QU629_RS15670	Predicted transcription regulator	-1.401593831
QU629_RS07915	QU629_RS07915	Antitoxin to RelE-like translational repressor toxin	-1.474898771
QU629_RS20640	QU629_RS20640	Altronate oxidoreductase	-1.488505669
QU629_RS20225	QU629_RS20225	Stress response diiron-containing protein YciF	-1.603197583
<i>amtB</i>	QU629_RS17080	Ammonium transporter	-1.610427948
<i>oxIT</i>	QU629_RS08565	Uncharacterized MFS-type transporter	-1.751503584
QU629_RS17460	QU629_RS17460	Metal-binding protein ZinT	-1.977493301
<i>Nac</i>	QU629_RS14600	Alkanesulfonate utilization operon LysR-family regulator Cbl	-2.222223145
QU629_RS06260	QU629_RS06260	RcnR-like protein clustered with cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcD	-2.510240798